



**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA**

**“EFECTOS DE LA FUENTE DE SELENIO, COBRE,
MANGANESO y ZINC, SOBRE LA RESPUESTA INMUNE
DEL CAMARÓN *Litopennaeus vannamei*.”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIOLOGO MARINO

REYES PEZO CHARLES ABRAHAN

TUTOR:

Acua. ZONNYA MENDOZA L., M.Sc.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2014

UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“EFECTOS DE LA FUENTE DE SELENIO, COBRE,

MANGANESO y ZINC, SOBRE LA RESPUESTA INMUNE

DEL CAMARÓN *Litopennaeus vannamei*.”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

AUTOR

REYES PEZO CHARLES ABRAHAN

LA LIBERTAD – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

A Dios por permitirme cristalizar mi anhelo.

A mis padres, mis hermanas y amigos que con amor y mucho sacrificio me guiaron por el sendero de la superación para poder cumplir con mi meta trazada de ser un gran profesional.

AGRADECIMIENTO

A las autoridades y personal Académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional.

En particular a la **Acuicultora Sonnya Mendoza tutora** de tesis porque con sus ideas científicas profesionales oriento nuestro trabajo, a la **M.Sc. Marita Monserrate**, al **Ing. Henry Roncal (Alltech)** y al **Biólogo Richard Duque**.

A los **Biólogos Carlos Gonzabay y Daniel Gonzaga** por su ayuda intelectual para poder culminar con mi Tesis de grado.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Gonzalo Tamayo C.

Decano Facultad Ciencias del Mar

Blgo. Richard Duque M.

Director Escuela Biología M.

Acuicultora Sonny Mendoza

Tutor de tesis

M. Sc. Marita Monserrate

Profesor de área

Ing. Ab. Milton Zambrano Coronado.

Secretario General-Procurador

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS	IXX
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FOTOS	XII
ABREVIATURAS	XIII
GLOSARIO	XVI
1. RESUMEN.....	XXI
2. INTRODUCCIÓN	XXV
3. JUSTIFICACIÓN	XXXI
4. OBJETIVO GENERAL	XXXIII
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	XXXIII
6. HIPÓTESIS	XXXIV
7.1 BIOLOGIA DE LA ESPECIE	1
7.2 DISTRIBUCIÓN	2
7.3 CICLOS DE VIDA	3
7.3.1 NAUPLIO	3
7.3.2 ZOEAE	4
7.3.3 MYSIS	5
7.3.4 POSTLARVA	6

7.3.5 JUVENIL – ADULTO	6
7.4 SISTEMA DE DEFENSA	7
7.4.1 BARRERA FÍSICA: EXOESQUELETO.....	7
7.4.2. MUDA	9
7.4.3 RITMO CIRCADIANO.....	10
7.4.4 SISTEMA INMUNOLÓGICO DEL CAMARÓN.....	12
7.4.4.1 COMPONENTES HUMORALES	13
7.4.4.1.1 PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO PLASMÁTICAS.....	17
7.4.4.1.2. AGLUTININAS.....	18
7.4.4.1.3 SISTEMA PROFENOLOXIDASA (proPO).....	18
7.4.4.1.4 SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS .	19
7.4.4.1.5 RADICALES LIBRES Y MECANISMOS ANTIOXIDANTES	19
7.4.4.2 COMPONENTES CELULARES	20
7.4.4.2.1 CÉLULAS INMUNO COMPETENTES O HEMOCITOS	20
7.4.4.2.2 HEMOCITOS HIALINOS.....	21
7.4.4.2.3 HEMOCITOS SEMIGRANULOSOS	21
7.4.4.2.4 HEMOCITOS GRANULOSOS.....	22
7.4.4.3 MECANISMOS DE DEFENSA A MEDICIÓN CELULAR	22
7.4.4.3.1 FAGOCITOSIS.....	22
7.4.4.3.2 NODULACIÓN	23

7.4.4.3.3 ENCAPSULACIÓN	24
7.4.4.3.4 COAGULACIÓN	24
7.4.4.4 INMUNIDAD ADQUIRIDA.....	25
7.5 MINERALES	28
7.5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS MINERALES	28
7.5.2 FUNCIÓN DE LOS PRINCIPALES MINERALES.....	30
7.5.3 COBRE	31
7.5.4 MANGANESO	32
7.5.5 SELENIO	33
7.5.6 ZINC	34
7.5.7 ABSORCIÓN DE MINERALES EN CRUSTÁCEOS	35
7.5.8 MINERALES ORGÁNICOS.	36
8. MARCO METODOLÓGICO	38
8.1 ÁREA DE ESTUDIO	38
8.2 MATERIALES Y EQUIPOS.....	39
8.2.1 MATERIALES	39
8.2.2 EQUIPOS UTILIZADOS	40
8.2.3 REACTIVOS	41
8.2.4 VIDRIERÍA	42
8.3 METODOLOGÍA	43

8.3.1 MÉTODO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS DIETAS.....	43
8.3.2 SIEMBRA Y LEVANTE DE POBLACION EXPERIMENTAL.....	44
8.3.3 PROTOCOLO DE TRABAJO	45
8.3.3.1. UNIDADES EXPERIMENTALES	45
8.3.3.2 DENSIDAD DE SIEMBRA	46
8.3.3.3 TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	46
8.3.3.4 BIOENSAYO.....	47
8.3.4 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN	49
8.3.4.1 PARÁMETROS PRODUCTIVOS.....	49
8.3.4.2 PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y ANALÍTICOS.....	50
8.3.4.3 PARÁMETROS INMUNOLÓGICO	50
8.5 ALIMENTO.....	51
8.5.1 PERIODO DE ALIMENTACIÓN	52
8.5.2 PARÁMETROS FÍSICO DEL AGUA.....	52
8.5.3 RECAMBIO DE AGUA.....	53
8.6 PROTOCOLO PARA MINERALES	53
8.6.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	54
8.7 PROTOCOLO PARA LAS PRUEVAS INMUNOLOGICAS	55
8.7.1 CUANTIFICACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO (O ₂ ⁻) POR REDUCCIÓN DEL NBT.....	55

8.7.2 ACTIVIDAD PRO FENOLOXIDASA (PO).....	58
8.7.3 PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY	61
8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	63
9.1 HEMOCITOS TOTALES.....	63
9.2 PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS	67
9.3 ANIÓN SUPERÓXIDO.....	68
9.4 FENOLOXIDASA	71
9.5 PROTEINAS PLASMÁTICA	72
9.6 ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE MINERALES	73
9.7 MINERALES (Zn, Cu, Mn, Se).....	75
9.8 RESULTADOS PRODUCTIVOS.....	77
9.9 PORCENTAJES DE CRECIMIENTOS	79
10. DISCUSIONES.....	81
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	87
11. BIBLIOGRAFÍA.	90
ANEXO I	107
ANEXO II.....	113
ANEXO III.....	119
ANEXO IV	121

ANEXO V	123
ANEXO VI	124
ANEXO VII	126

ÍNDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS

FIGURA 1.- COMPONENTES CELULARES Y HUMORALES DEL SISTEMA INMUNE EN CRUSTÁCEOS	12
FIG. 2: PARED DE CELULAR DE BACTERIA GRAM POSITIVA.....	15
FIG. 3: CUANTIFICACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO (O ₂ ⁻) FUENTE- CENAIM LABORATORIO DE INMUNOLOGIA	58
FIG. 4: ACTIVIDAD FENOLOXIDASA (PO) FUENTE- CENAIM LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA.....	61
FIG. 5. PROTOCOLO DE LOWRY (PROTEÍNAS PLASMÁTICAS).....	62
GRÁFICO 1. CONTEOS TOTALES POR TIPOS DE HEMOCITOS PRESENTES EN LA HEMOLINFA DE LOS ADULTOS DE L. VANNAMEI	66
GRÁFICO 2. CONTEOS TOTALES EN µg/µL DE ANIÓN SUPEROXIDO BASE, ESTIMULANTE Y TASA	70
GRÁFICO 3. CONTEOS TOTALES EN µg/µL DE FENOLOXIDASA SIN LAMINARINA Y CON LAMINARINA.....	72

GRÁFICO 4. CONTEOS TOTALES EN $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	73
GRÁFICO 5. CONTEOS TOTALES EN MG/KG DE MINERALES COMO ZINC, COBRE, MANGANESO Y SELENIO	76
GRAFICO 6. BIOMASA INICIAL, BIOMASA FINAL, INCREMENTO DE BIOMASA Y SUPERVIVENCIA DE JUVENILES L. VANNAMEI.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- COMPOSICION QUIMICA DEL CAPARAZON.....	8
TABLA 2: CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS ELEMENTOS MINERALES ESENCIALES	29
TABLA 3: REQUERIMIENTOS MANUAL PARA DIETAS COMERCIALES DE CAMARÓN	34
TABLA 4. NIVELES DE NUTRIENTES RECOMENDADOS PARA CAMARONES CARNÍVOROS.....	36
TABLA 5. COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE LAS DIETAS DEL ENSAYO	48
TABLA 6. PORCENTAJE EN mg/kg DE LOS MINERALES EN EL ALIMENTO	51
TABLA 7. ANÁLISIS DE TIPOS DE HEMOCITOS Y PORCENTAJES (HH, HS, HG, HT)	64

TABLA 8. CONTEOS TOTALES EN $\mu\text{G}/\mu\text{L}$ DE ANIÓN SUPEROXIDO, FENOLOXIDASA Y PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	68
TABLA 9. CONTEOS TOTALES POR MG/KG DE MINERALES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS PRESENTES EN LA HEMOLINFA	74
TABLA 10. RESULTADOS PRODUCTIVOS DE GANANCIA DE PESO POR TRATAMIENTO, FCR Y SUPERVIVENCIA.....	78
TABLA 11. HEMOGRAMA DE HEMOCITOS TOTALES	107
TABLA 12. PORCENTAJES DE HEMOCITOS TOTALES.....	113
TABLA 13. PROTEINAS PLASMÁTICAS.....	119
TABLA 14. ANIÓN SUPERÓXIDO	121
TABLA 15. FENOLOXIDASA.....	123
TABLA 16. MINERALES	124

ÍNDICE DE FOTOS

FOTO 1. UBICACION GEOGRAFICA DEL CENAIM.....	38
FOTO 2. PELLET DE LA PREMEZCLA CON MINERALES	43
FOTO 3. SET EXPERIMENTAL CENAIM-ESPOL (GAVETAS).....	45
FOTO 4. SIEMBRA DE LAS LARVAS PL 12	126
FOTO 5. PESCA DE LOS CAMARONES.....	126

FOTO 6. ACLIMATACIÓN DE LOS CAMARONES	127
FOTO 7. SEP DEL BIOENSAYO	127
FOTO 8. SELECCIONAR CAMARONES DE 1g	128
FOTO 9. ELABORACIÓN DE LAS DIETAS.....	128
FOTO 10. RECAMBIO Y AREACIÓN DEL AGUA	129
FOTO11. PARÁMETRO FÍSICO PH.....	129
FOTO 12. PARÁMETRO FÍSICO TEMPERATURA	130
FOTO 13. ALIMENTACIÓN.....	130
FOTO 14. SIFONEAR EL SOBRANTE DEL ALIMENTO	131
FOTO 15. EXTRACCIÓN DE LA HEMOLINFA	131
FOTO 16. ANIÓN SUPERÓXIDO NBT	132
FOTO 17. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA	132
FOTO 18. PROTEINAS PLASMÁTICAS	133

ABREVIATURAS

App: Activating Protein

Ac. Ba: Actividad Base

Ac. St.: Actividad Estimulante

Bi: Biomasa Inicial

Bf: Biomasa Final

Con La: Con Laminar

Cu: Cobre

FCA: Factor de conversión alimenticia

GP: Ganancia en peso

H: Hemocitos

H₂O₂: Peróxido de Hidrogeno

HG: Hemocitos Granulosos

HH: Hemocitos Hialinos

HP: Harina de Pescado

HS: Hemocitos Semigranulosos

HT: Hemocitos Totales.

LB: Incremento de biomasa

LPSBP: Lipo Polysaccharide Binding Protein (Proteína de unión Lipopolisacárido).

LPS: Lipopolisacárido

MI: Mineral Inorgánico

Mn: Manganese

MO: Mineral Orgánico

NADPH: Enzima transportadora de electrones

NAG: N-acetilglucosamina

NAM: Nacido acetilmuramico

NHT: Número Total de Hemocitos

(O₂⁻): Anión Superoxido

P: Probabilidad

PAMP: Patrones asociados moleculares patógenos.

Pf: Peso medio final de los organismos

PG: Porcentaje Granulosos

PHH: Porcentaje Hemocitos Hialinos

PHS: Porcentaje Hemocitos Semigranulosos

PM: Proteínas Plasmáticas

PO: Profenoloxidasa

proPO: Pro profenoloxidasa

PRR: Patrones de reconocimiento receptores

ROI: Reactivos de Oxígeno Intermediarios

S: Supervivencia

Se: Selenio

Sin La: Sin Laminar

μl: Micro litro

Zn: Zinc

GLOSARIO

Aclimatar: Ajuste de un organismo a nuevas condiciones ambientales

Aireador: Equipo usado para introducir aire en el agua, estos pueden ser sistemas mecánicos, gravitacionales y de difusión.

Aeróbico: Condición o proceso donde está presente el oxígeno gaseoso.

Alcalino: Que tiene un pH mayor a 7.

Analito: En química analítica un **analito** es el componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra. Son especies químicas cuya presencia o concentración se desea conocer. El analito es una especie química que puede ser identificado y cuantificado, es decir, determinar su cantidad y concentración en un proceso de medición química, constituye un tipo particular de mensurando en la metrología química.

Bioensayo: Experimento que se hace utilizando organismos vivos, bajo condiciones y ambientes controlados.

Biomasa: Suma total de la materia de los seres que viven en un ecosistema determinado, expresada habitualmente en peso estimado por unidad de área o de volumen.

Cefalotórax: “Cabeza” del camarón; estructura que contiene órganos y tejidos propios del tórax y de la cabeza.

Fagocitosis: La fagocitosis es la más común de las reacciones de los organismos. Son procesos digestivos enzimáticos propios, se observan en las células fagocitarias otros fenómenos que conducen a la formación de radicales de oxígeno, altamente reactivos y tóxicos.

Hemograma: (Cuantificación de células hemocitarias), el hemograma corresponde a la determinación del número de hemocitos/ml de hemolinfa extraída del camarón con una solución anticoagulante. La cuantificación de las células se realiza por observación microscópica (fotónica) en un Hemocitómetro de tipo Neubauer.

Hemocito: Células características responsables de la respuesta inmune de los crustáceos. Serán estudiados con detalle en la unidad correspondiente al sistema inmunológico.

Hemocito hialino: Presentan un delgado citoplasma basófilo, un núcleo amplio y céntrico. son células que se adhieren y se extienden fácilmente, no contienen gránulos densos los hemocitos hialinos inician la defensa contra patógenos externos con el proceso de coagulación, un mecanismo crítico que sirve para proteger al camarón de una pérdida excesiva de líquidos así como para capturar e inmovilizar microbios invasores.

Hemocito granuloso: Se caracterizan por ser células grandes, poseen grandes gránulos, alta relación citoplasma-núcleo y excéntrico, inclusiones citoplasmáticas, así como un retículo endoplasmático liso y ribosomas libres en citoplasma. Estos hemocitos almacenan las enzimas que constituyen el sistema

proPO en los crustáceos a un nivel más alto que los semigranulosos los hemocitos granulosos secretan enzimas defensivas que dan muerte a los microbios antes de ser eliminados por otros granulocitos mediante los procesos de fagocitosis o encapsulación, una vez que los microbios son encapsulados o fagocitados; el proceso de melanización (que también es liderado por los hematocitos granulosos) los deja inertes y los prepara para ser expulsados mediante la excreción cuticular o durante el próximo ciclo de muda.

Hemocito semigranuloso: Poseen un núcleo esférico o en forma de herradura y muchos gránulos pequeños de forma redondeada. En los camarones, estas células intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema profenoloxidasa (proPO) (melanización). Además ellas sintetizan y liberan las peneidinas, péptidos antimicrobianos, tienen moderada refringencia cuando se observan al microscopio de contraste de fase.

In situ: Que se realiza en el mismo sitio.

Inmersión: Entendida como la inclusión de un sólido en un líquido.

Inmunología: Rama de la biología que estudia los fenómenos inherentes a la inmunidad y, de una forma general, todos los procesos que tienen relación con la antigeneidad y con la elaboración de los anticuerpos.

Inmunidad: Es el conjunto de procesos de defensa que se manifiestan ante la presencia de moléculas extrañas (Vásquez *et al.*, 1998). Durante la evolución se han seleccionado dos sistemas que proveen defensa interna contra agentes infecciosos; el sistema inmune innato natural y el adquirido que es adaptativo

(Van de Braak *et al*, 1996), la inmunidad adquirida es filogenéticamente joven, se encuentra solamente en vertebrados y opera a través de los linfocitos.

Inyección: Es un procedimiento mediante el cual se hace pasar un líquido o un material viscoso a través de un tubo o un conducto circular para un determinado fin.

Juvenil: Estadio en el cual un organismo ha adquirido la morfología del adulto, pero aun no es capaz de reproducirse.

Melanización: La melanina es una molécula tóxica para las bacterias y los hongos cuya producción está regulada por una enzima: la fenoloxidasa. Este tipo de estructura puede ser observada en histología.

Nodulación: Dentro de los cuales los patógenos son destruidos, en particular mediante el proceso de:

Postlarva: Estado que ocurre después del estado larval, parecido al juvenil pero aún le faltan algunas características. Para crustáceos el estado siguiente a la metamorfosis de larva zoea a juvenil. En camarones peneidos, normalmente se cuentan los días después de la aparición de las características de postlarva. Ej., PL12 indica que la postlarva ha vivido 12 días desde su metamorfosis desde el estado de mysis.

Radicales oxigenados tóxicos: Muchos compuestos oxigenados son tóxicos para las células vivas, los más importantes reactivos oxigenados son: el Anión

superóxido o singlete de oxígeno (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH).

Translúcida: *adj.* Dic. Del cuerpo que deja pasar la luz, pero que no permite ver lo que hay detrás de él.

1. RESUMEN.

Las enfermedades han sido consideradas como las principales causas de grandes pérdidas en la industria camaronera, provocando un déficit en la rentabilidad y en algunas ocasiones de la sustentabilidad del sector. “La sustentabilidad y la sostenibilidad de la industria camaronera se basa en mantener no solo estrategias de manejo técnico sino estrategias de un manejo que controle profiláctico que controle los patógenos más frecuentes tales como bacterias del género *Vibrio* y virus como el más impactó al sector como fue el virus de la mancha blanca”. WSSV (Berger, 2000).

“Sabiendo que el sistema inmunológico en los camarones no es específico ni posee como en los vertebrados la capacidad de reconocer específicamente agentes invasores recurrentes” (Berger, 2000), el empleo de ciertas herramientas profilácticas como las vacunas, en la prevención de enfermedades se han visto poco exitosas: Sin embargo a pesar de su sistema de defensa poco desarrollado se ha podido medir una capacidad de respuesta que produce una protección en frente de agentes patógenos que les causan enfermedades. Es así que respuestas celulares por hemocitos y humorales han sido medidas para verificar que ciertas moléculas ayudan en la protección de estos invertebrados en brotes de enfermedades.

Siendo las enfermedades una de los problemas más frecuentes que ocasiona grandes pérdidas, el uso de productos que activen el sistema inmunológico de los camarones ha cobrado gran interés en el sector acuícola en general. Bajo este esquema son ya muchos los productos que se incluyen directamente en las dietas de alimentos balanceados desde las fábricas o se incluyen directamente en el campo, lo que a con llevado a desarrollo de investigación en esta línea que justifique y evidencie el real estímulo que estos productos están provocando.

Una de las temáticas planteadas en este trabajo, fue la de demostrar que no solo productos conocidos (B glucanos, LPS, PG) que ayudan a estimular al sistema inmune de los camarones son las únicas alternativas de uso, es así que se planteó el uso de minerales orgánicos comparados con los minerales inorgánicos que son empelados de manera rutinaria en la preparación de dietas balanceadas podrían tener una activación también del sistema inmunológico.

La medición de la respuesta inmunológica tanto de los minerales orgánicos como los minerales inorgánicos, fue realizada mediante su estimulación celular empleando pruebas inmunológicas que nos permitan determinar mediante el uso de hemogramas conteos totales y puntuales de los hemocitos, respuestas de proteínas plasmáticas, reacciones enzimáticas que permitan ver la activación celular de ambos minerales.

Los resultados hematológicos indicaron los resultados de interacciones Harina Pescado x Mineral, observándose que no hubo diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$) para el número de Hialinos, semigranulosos y totales. En el caso del número de granulosos, la diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) fue para mineral inorgánico. Hubo similitud de resultado estadístico para el porcentaje de granulosos con el uso de 100% mineral orgánico u inorgánico.

El reemplazo mineral y reducción de harina de pescado tampoco generó diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en el porcentaje de hialino.

Dentro del mecanismo de defensa se observó interacciones estadísticas HPxM en el resultado de la Fenoloxidasa y la tasa de peróxido (= relación standard sobre la base). Con ello se aprecia con el uso de minerales orgánicos e inorgánicos una igualdad estadística ($p < 0.05$) en la Tasa y Fenoloxidasa con - La (Laminarina) pero mejor respuesta en Fenoloxidasa sin-La al uso de 50% mineral orgánico.

El tratamiento 8 (100% mineral orgánico) obtuvo la mejor respuesta ($p < 0.05$) en valores de Proteína Plasmática, en tanto la peor fue para T-1 con 100% mineral inorgánico.

Las interacciones a nivel histológico entre HPxMI para el Zinc y Selenio evidenciaron que niveles de 50% mineral orgánico generan respuestas diferentes estadísticamente significativas ($p < 0.05$) tan igual como emplear 0% harina de pescado. En cambio para el Zinc, el uso de la fuente mineral al 100% no dio diferencias.

Los valores en tejido de Cu y Mn por grupo fueron similares estadísticamente, pero las mejores tendencias positivas fueron para el T-8 con 100% mineral orgánico en Cobre; para el Mn lo fue con el T-1 con 100% mineral inorgánico.

A nivel de los resultados productivos el peso final promedio y FCR con el uso de 100% minerales orgánicos y 50% harina pescado (Tratamiento E) se obtuvieron mejores resultados. Para el caso del tratamiento de 100% Mineral inorgánico se observaron tendencias positivas en incremento de biomasa y la sobrevivencia que los orgánicos.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción acuícola sostenible se respalda con los trabajos de investigación científica enfocados a controlar las enfermedades, su prevención se basa en el uso de productos que sean amigables con el medio ambiente y que no causen daño alguno (*environmental-friendly*). Esta estrategia se empela con las difefentes especies en producción.

La producción de camarones del género peneidos se encuentra amenazada por infecciones bacterianas y virales, que en algunos casos y países han causado daños con perjuicios para la producción, estos problemas son graves y a menudo poco conocidos. De acuerdo a las regulaciones, las demandas de los consumidores se restringen la cantidad de medicamentos permitidos para combatir estos patógenos. “Las enfermedades causadas por *Vibrios sp.* Fueron las que emplearon antibióticos cada vez más fuertes, la prohibición se debió al alto riesgo de transmisión horizontal hacia el consumidor final. Se ha podido evidenciar que el uso de antibióticos deprime el sistema inmunológico en peces y en camarones” (Austin, 2010).

“El desarrollo de la industria se ve respaldada en poder contar con estrategias y métodos confiables para la prevención y el control de las enfermedades”

(Bachère, 2000). En la actualidad se está trabajando en conocer los efectores inmunitarios de los animales, ya sea de manera innata o inducida, o en el desarrollo de animales modificados genéticamente que puedan ser capaces de resistir a dichas patologías.

Las diferentes modalidades de cultivo, hacen que los animales sean expuestos a condiciones de stress, siendo una de las causas principales de manifestaciones de enfermedades, en los sistemas de producción el manejo de enfermedades son muy complejos, debido a las múltiples variables inducidas, medioambientales que se presentan, es así que la profilaxis mediante el uso de sustancias, compuestos, moléculas y químicos que permiten controlar dichos problemas.

Entre las sustancias mayormente empleadas en los diferentes sistemas acuícolas que han evidenciado una activación del sistema de defensa celular y humoral, son LPS, B Glucanos, bacterinas, vacunas (en crustáceos las vacunas tienden a ser ineficaces, ya que carecen de un sistema inmune específico). “Los aceites esenciales, probióticos, prebióticos, los minerales traza y los carotenoides entre otras, en diversas investigaciones, han demostrado mejoras en sanidad, desempeño y reproducción en muchas especies”. Dr.: Víctor Manuel Alfaro López, 2011.

En la actualidad se ha obtenido mejoras en el control de enfermedades, a través del uso puntual o continuo de estas moléculas profilácticas en los alimentos de uso en animales de cultivos, ya que refuerzan y mejoran la salud. Esta capacidad de actuar como inmunoestimulantes o inmunomoduladores es debido a que fortalecen la función de las células hemocitarios, ayudando a activar los sistemas de reconocimiento y neutralización moléculas que causen daño a los animales.

Por esta circunstancia los investigadores han trabajado para obtener conocimientos técnicos en los diferentes sistemas de producción de la acuicultura y en el manejo de problemas en la salud de los animales de cultivo usando métodos no tradicionales, a nivel de campo se están incorporando no solo las moléculas antes mencionadas sino que se está trabajando en la incorporación de fuentes de minerales orgánicos, que se obtienen a partir del procesamiento de diferentes fuentes. “Entre las fuentes más conocidas citamos la harina de algodón, salvado de trigo y de arroz, solubles de destilación y de pescado, harina de kril y levadura, harina de sangre y de maíz, subproductos de la molienda de arroz y salvado de trigo que son excelentes fuentes de Selenio, Zinc, Cobre y Magnesio” (Marcillo, F. 2001). En la actualidad la mayoría de plantas de alimento balanceado trabajan con fuentes minerales inorgánicas, por no tener disponibilidad de fuentes orgánicas que demuestren ser costo eficiente.

La estrategia para mejorar la ingesta es la de cambiar la inclusión inorgánica por una cantidad orgánica que sustente beneficio productivo y salud en el animal; proporciona no solo mejoras en los animales sino un beneficio al medio ambiente disminuyendo los residuos e incrementando los beneficio para el consumidor.

En las especies acuícolas el uso de derivados de aves y mamíferos son de gran ayuda en la formación de su esqueleto formación de sus tejidos blandos activación de las respuestas nerviosas y en condiciones de stress ambiental, ayudan a la regulación del pH de la sangre evitando deprimir el sistema inmunológico de los animales. Se les adjudica también el rol de ser activadores enzimáticos y permitir la captación o mejor función de vitaminas, enzimas, hormonas.

La industria acuícola ha venido empleando minerales inorgánicos de manera rutinaria en la elaboración de sus dietas balanceadas para diferentes especies de cultivo, se dice que la aplicación de estos minerales inorgánicos dificulta mucho su absorción en los animales. Este problema se ha reducido mediante la incorporación de concentraciones más altas de estos minerales inorgánicos en las dietas para lograr a suplir los requerimientos nutricionales de los animales, esta iniciativa ha provocado un posible impacto y deterioro del medio ambiente lo que ha llevado a los productores de alimentos balanceados a buscar alternativas en el uso de minerales orgánicos para un mejor manejo medio ambiental y mejoras de la absorción en los animales.

Es Así que el remplazo de estos minerales inorgánicos por el uso de minerales orgánicos que aseguran tener una mejor biodisponibilidad, mejor absorción y causar menos deterioro del ambiente, se buscará suplir cubrir las necesidades de las especies acuícolas sin necesidad de incorporar cantidades innecesarias que brinden mejoras en el crecimiento, absorción en los animales, suplir requerimiento esenciales, por su capacidad de quelatar aprovechar las vitaminas que se incorporen en las dietas y mejorar el impacto económico que con lleva incrementar su inclusión en los alimentos balanceados.

En la industria acuícola la mayor capacidad de ingestión de estos minerales son tomados de las aguas de los cultivos, esta absorción dependiendo de la especie lo toman a través de órganos especializados como las branquias o simplemente por su superficie cutánea. La gran mayoría de minerales obtenidos vienen de los ingredientes del alimento, de la capacidad de absorción, dependiendo de la especie si es de agua dulce o salada, además de la presión osmótica a la que son sometidos ambos grupos.

En la acuicultura la incorporación de los minerales inorgánica, son incluidos mediante la combinación de la matriz de la formulación respectiva a cada especie a ser alimentada. El empleo de fosfatos, carbonatos, óxidos mezclados con estos minerales inorgánicos no ayuda a mejorar su absorción lo que los vuelve ineficaces. Al tener una baja absorción por el intestino este no son llevados al sistema circulatorio y no podrán ser mantenidos en diferentes órganos y tejidos de

los animales del cultivo. Es con este fin que la utilización de minerales orgánicos al mejorar su absorción presumimos que si puedan ser absorbidos en los diferentes tejidos de los animales.

Alrededor del 20% de los minerales inorgánicos en acuicultura son absorbidos, es por esto el incremento en las dietas para tratar de compensar los requerimientos nutricionales en los animales garantizando que el animal reciba y pueda metabolizar lo que en realidad necesita.

“Los minerales orgánicos que presentan mejor biodisponibilidad, son los quelados con aminoácidos, actuando estos en la protección de las sustancias del jugo gástrico mejorando la digestibilidad de los animales”: Rodríguez A, 2013.

3. JUSTIFICACIÓN

El empleo de estimuladores del sistema inmune, como alternativa al uso de antibióticos y quimioterapéuticos es en la actualidad, materia de investigación para determinar de manera precisa los mecanismos de acción y sus efectos en los cultivos de camarón.

El uso de micro-organismos amigables llamados probióticos, en la denominada exclusión competitiva, tiene como principio que estos organismos ocupen espacio y demanden nutrientes en el agua y en el fondo del estanque, así como en el tracto digestivo del camarón a fin de reducir las posibilidades de colonización y desarrollo de patógenos brindando mineralización, reducción de compuestos tóxicos y nutrición.

Los minerales cumplen un rol importante en la nutrición porque aunque no proporcionan energía son esenciales para la utilización y síntesis biológica de nutrientes esenciales. “Las condiciones de la acuicultura extensiva y semi intensiva de camarones no permite determinar signos muy visibles de deficiencia de uno o más minerales; sin embargo, en el caso de los peces es un poco más sencillo verificar las falencias. Así, es posible que este ámbito no desarrollado ni investigado en amplia magnitud” Power (2006).

Las cuales son moléculas orgánicas que permiten una alta biodisponibilidad y bioactividad. Investigaciones en campo han demostrado que la inclusión permite mejoras en sanidad, desempeño y reproducción en muchas especies. “Actualmente se están desarrollando el concepto de “reemplazo total”, la cual consiste en cambiar la inclusión inorgánica por una cantidad orgánica que sustente beneficio productivo y salud en el animal; beneficio al medio ambiente por disminuir los residuos; y beneficio para el consumidor con mejoras en la calidad nutricional y organoléptica de los productos generados”. (Leeson, 2008).

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adición de oligoelementos, mediante la dosificación de dietas pre-mezcladas, en el fortalecimiento de la respuesta inmune de *Litopennaeus vannamei*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar el uso de la pre mezcla mineral inorgánica adicionadas en las dietas del camarón, la incidencia en la relación talla-peso, y factor de conversión alimenticia, supervivencia.
- Analizar la bioacumulación mineral en el exoesqueleto de Se, Cu, Mn, Zn.
- Evaluar el número de Hemocitos, Fenoloxidasa, actividad bacteriana y proteína plasmática, como indicadores de la respuesta inmune.

6. HIPÓTESIS

El reemplazo de la fuente mineral inorgánica por orgánica, mejoran el sistema inmunológico del camarón *Litopenaeus vannamei* influyendo de manera directa en la mejora de la salud de los animales.

7. MARCO TEORICO

7.1 BIOLOGIA DE LA ESPECIE

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es una especie de crustáceo de la familia Penaeidae, nativo del oriente del Océano Pacífico, desde el noroeste del Perú hasta el noroeste del estado de Sonora, México, donde el ciclo de vida de este crustáceo puede ser dividido en dos fases: la marina y la estuarina. Con respecto a su habitat es una especie característica de las aguas con fondos lodosos (o arenas con lodo) entre 5 y 72 m de profundidad. Los adultos se encuentran en ambientes netamente marinos, mientras que las crías y juveniles se desarrollan en los estuarios y lagunas salobres. Esta especie está restringida a aguas con temperatura promedio anual de 20 °C.

“Alcanza una longitud máxima de 230 mm, con caparazón de 90 mm. Presenta un color blanquecino a amarillento con la parte dorsal del caparazón un poco más oscura. Rostro con ocho o nueve dientes superiores y uno o dos inferiores, anteriores al diente epigástrico”. (Muñoz, 2004).

Las características generales de los crustáceos es que tienen respiración branquial, y por ello deben vivir en el agua. Unos pocos pueden vivir en agua dulce y sobre tierra. Las branquias están colocadas en cada lado del cuerpo, en la cavidad traqueal. Su aparato secretor comprende dos glándulas verdes colocadas en una depresión en la base de las antenas y su sistema nervioso comprende el cerebroide y la cadena ventral. “La fecundación es externa, por medio de huevos” (Branford 1981, Rönnbäck et al. 2002).

“La reproducción del camarón comienza en aguas alejadas de la costa, cuando el macho deposita en la hembra un paquete de esperma que fertiliza los huevos a medida que son puestos, la madurez de las hembras se evidencian con las visualización en la parte del carapacho a tras luz de una coloración verde” (Muñoz, 2004).

7.2 DISTRIBUCIÓN

“La distribución de los camarones es en la zona intermareal, asociados a estuarios y lagunas costeras, presentando suelos muy blandos y vegetación tipo manglar” (Branford 1981, Rönnbäck et al. 2002); “su ciclo de vida es planctónico en estadios primarios y marinos en estadios superiores” (Boschi 1974, Gillett 2008 (Gillett 2008).

Así, los estuarios y lagunas costeras son ecosistemas muy ricos e importantes para los camarones blancos, porque son lugares bastos en alimento y fungen como sitios de alimentación y crianza no sólo para estos organismos, sino para otras especies marinas, tales como cangrejos y peces.

7.3 CICLOS DE VIDA

El desarrollo de los camarones es muy complejo, cuando las larvas eclosionan, cerca del fondo marino tienen un estadio pequeño y simple (con pocas estructuras en su cuerpo) conocido como nauplius o nauplio y conforme van desarrollándose, estas larvas van aumentando el número de sus apéndices y van cambiando su recubrimiento quitinoso en un proceso que se conoce como ecdisis o muda y entonces, transforman drásticamente su apariencia corporal, de tal forma que van pasando por varios estadios larvarios divididos en: nauplius, zoea, mysis, postlarvas y juveniles. Los juveniles crecerán hasta convertirse en adultos sexualmente maduros; los adultos tienen un período continuo de reproducción a lo largo de todo el año, con mayor o menor intensidad en algunos meses dependiendo de la especie.

7.3.1 NAUPLIO

El estadio de nauplio consta de cinco subestadios y toda su fase dura aproximadamente entre 40 y 50 horas. Es esta fase la longitud promedio del organismo es de 0.50 mm y un ancho de 0.20 mm (dependiendo de la temperatura y calidad del mismo).

Durante la fase la larva se alimenta del vitelo presente en su cuerpo. La abundancia y riqueza del vitelo tiene relación con aspectos de alimentación de los reproductores, carácter genético y fisiológicos.

7.3.2 ZOEAE

La fase de Zoea (protozoa) consta de tres subestadios y comprende un periodo de duración de 4 a 6 días (dependiendo del manejo y calidad de la larva), con tamaños de 1.0 mm a 2.6 mm de longitud total. “Al ser filtradoras su alimentación es a base de fitopláncton que absorben del agua del cultivo” (Arellano, 1990).

Las especies de fitoplancton más comunes y de mejor calidad para la alimentación de larvas de camarones son las siguientes: *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis suecica*. La densidad de *Chaetocero sgracilis* utilizada para la alimentación de todo el estadio de zoea se encuentra alrededor de 100,000 cél/ml y para

Tetraselmis suecica en densidades de hasta 20,000 cél/ml. La segunda y tercera etapa alcanzan a los 9 días una longitud total de 2,7 mm.

Morfológicamente, tienen ojos separados, aparición de los pares cuarto y quinto de pereopodos birramosos, dos nuevas espinas en el telson, provistos de caparazón cefalotorácico, un par de espinas supraorbitales y un par de aristas puntiagudas en la parte antero-ventral del caparazón.

“El quinto segmento abdominal presenta dos puntas laterales. presenta 5 pares de pereopodos birramosos, los pleopodos no se aprecian, el telson se mantiene fusionado al sexto segmento abdominal previsto de 16 setas o espinas plumosas” (Polo & Chamorro 2000),

7.3.3 MYSYS

“Es el tercer estadio larval, este consta de tres subestadios con una duración total de 3 días hasta su metamorfosis a post – larva, presentando un nado con la cabeza inclinada y abdomen segmentado” (Edemar *et al.*, 1996),

“En este estadio la alimentación incorpora nauplios de *Artemia*, Rotíferos y Nemátodos” (Arellano, 1990)

7.3.4 POSTLARVA

El estadio de postlarva dura de 10 a 15 días, en esta etapa ya no se presentan grandes cambios morfológicos como sucede en los estadios anteriores.

Durante esta etapa, la postlarva se mantiene con alimentación de nauplios de artemia, su alimentación comprende una dieta a base de algas en poca cantidad y la adición de dietas artificiales que le brinden una nutrición más balanceada.

“Además de la alimentación de los organismos, uno de los factores más importantes para lograr una buena sobrevivencia es la tecnología del cultivo y la revisión diaria de los organismos”. (Macabee, B.J., Bruce, J.W 2003)

7.3.5 JUVENIL – ADULTO

“En esta etapa los camarones ya tienen bien formadas sus estructuras. La clasificación rostral presenta de 7–10 dientes dorsales y 2–4 dientes ventrales. La caracterización sexual se presenta en machos maduros petasma semi abierto con

espermátóforos completamente funcionales en el interior de una vaina, Su coloración es normalmente blanca translúcida” (Macabee, B.J. 2003) , las hembras su organo reproductor consta de un el téllico abierto.

7.4 SISTEMA DE DEFENSA

Las primeras barreras de defensa físicas que tienen los camarones están constituidas por el exoesqueleto y la membrana peritrófica. El exoesqueleto impide que ciertos patógenos ataquen al animal de manera directa y la membrana peritrófica proteger el epitelio digestivo. “Otro mecanismo que los camarones emplean como barrera de defensa es el desplazamiento de los hemocitos hacia los sitios que presentan invasores permitiendo que estos activen las enzimas y proteínas de defensa, mediante la producción de sustancias que actúan en la reparación cuticular causada por agentes patógenos y en prevenir la extensión de estas con procesos coagulantes que impiden que se magnifiquen las afecciones” (Destoumieux y cols., 2000).

7.4.1 BARRERA FÍSICA: EXOESQUELETO

Los crustáceos son artrópodos - invertebrados provistos de miembros articulados como los insectos y los arácnidos. Se caracterizan por tener el cuerpo cubierto de una coraza cutánea formada, en parte, por carbonato de calcio, como si fuera un

esqueleto externo. El exoesqueleto compuesto por quitina formada N-acetil-D-glucosamina y proteínas es quien le proporciona rigidez al animal. Esta cutícula internamente posee una membrana basal que permite el contacto directo con la sangre o hemolinfa.

Químicamente está constituida por: quitina, proteínas, pigmentos y cenizas con alto porcentaje de calcio (Tabla 1.)

TABLA 1.- COMPOSICION QUIMICA DEL CAPARAZON

COMPONENTE	PROCENTAJE
QUITINA	17 – 32
PROTEINA	17 – 42
PIGMENTOS	1 – 14
CENIZA	41 – 46

Shari Rene Baxter. 2004

7.4.2. MUDA

“La muda en los crustáceos se caracteriza por la remoción periódica del exoesqueleto en todas sus capas permitiendo que se dé el crecimiento de los animales” (Chang 1991). El conocimiento de los diferentes estadios de muda se puede establecer periodos de alimentación que ayuden a la mejora del crecimiento o en prevenir las enfermedades mediante ayudas profilácticas que protejan al animal cuando se vuelve más susceptible. Cuando la muda ocurre en sistemas donde los animales se encuentran contaminados o infectados por patógenos Es posible que cuando la muda se da en ambientes con animales enfermos patógenos, la propagación de las enfermedades se da en una forma exponencial debido a que los animales se encuentran más débiles siendo presas fáciles a ser atacados estos.

Por otra, parte se ha sustentado que existe una relación directa entre el ciclo de muda y ciertas enfermedades. Dicha relación se debe a que al estar débil y desprotegido el animal puede ser fácil presa de patógenos. Enfermedades como el Síndrome de Taura, la Mancha Blanca e IHHNV donde presentan flacidez en el exoesqueleto de los animales, con retardos en superar la ecdisis caso particular que se relacionan con la muda.

“Desde el punto de vista de la rentabilidad productiva, la alimentación en base a una tabla referenciada a la biomasa sin tomar en consideración los estadios de muda por las que atraviesan los animales, con llevarán en un incremento del

factor de conversión alimenticia y por consiguiente una inflación en los costos del cultivo” (Molina 2001). El conocimiento de la correlación de la muda con las fases de la luna ayudaría a tener manejos más adecuados que influyan directamente en la aplicación o no del alimento balanceado, a tener animales con poca flacidez que permitan su aceptación en las empacadoras, a optimizar los costos de producción precio de poder planificar las cosechas de una manera más eficientes sin tener animales blandos que perjudiquen la calidad del producto final al arribo a las empacadoras.

7.4.3 RITMO CIRCADIANO

El conocimiento del ritmo circadiano ya desarrollado en diferentes investigaciones proporciona una guía exacta y confiable para manejar las tablas de alimentación, ya que de manera rutinaria todas las granjas camaroneras se rigen a una tabla que no es modificada ni por animales enfermos, ni por estadios de muda de los animales. La alimentación en fincas camaroneras está basada en su gran mayoría en tablas de alimentación para el cálculo de la ración, las cuales no consideran ni los hábitos naturales de alimentación ni el estado fisiológico por el que atraviesa el organismo.

La nutrición de camarones implica procesos químicos y fisiológicos que proveen nutrientes al animal para sus funciones normales, de mantenimiento y

crecimiento. Una parte importante de estos procesos es la digestión, que involucra descomposición mecánica, solubilización y absorción de nutrientes, el cual depende de la anatomía y fisiología del sistema digestivo de cada especie.

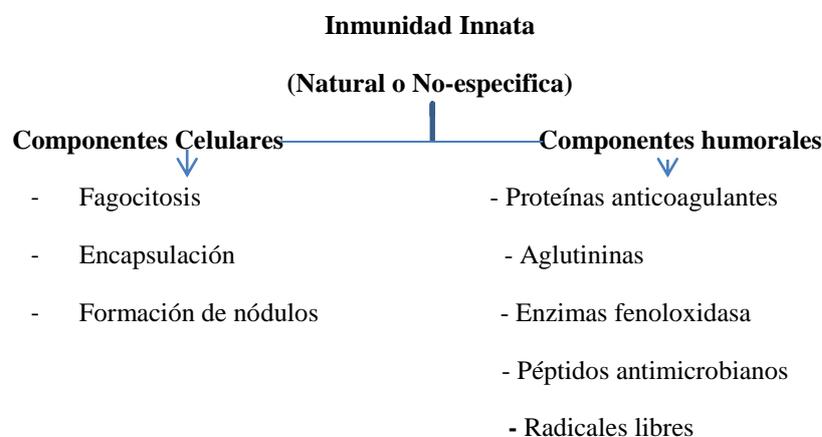
Es conocido ya que en crustáceos la producción enzimática reportada en varios trabajos de investigación la similitud de horas que imparten horarios puede ser empleada como una estrategia de alimentación para mejorar la digestibilidad de los animales y disminuir costos de producción (CENAIM. 2000)

Robertson *et al.* (1987) “confirman que existe una correlación entre la muda y el ciclo lunar”. Griffith y Wigglesworth (1993). “Trabajos realizados Ecuador y Colombia trabajos con camarones *P. vannamei* y *P. schmitti* presentaron un incremento de 1 g. por semana en las fases de luna nueva y llena” .Así también, Dall (1986) y Chan *et al.* (1988) demostraron que durante las fases de muda el animal suspende su alimentación lo que hace que se modifique las tablas de alimento. Este factor es un puntal importante para los sistemas productivos ya que el costo más alto lo asume el alimento balanceado.

7.4.4 SISTEMA INMUNOLÓGICO DEL CAMARÓN

“El sistema inmunológico de los camarones peneidos está controlado por las células de hemocitos (hialinos, granulares, y semigranulares), quienes son responsables de la comunicación y reconocimiento intra celular en presencia de patógenos o agentes extraños, mediante una acción citotóxica donde utiliza respuestas de defensa como la de coagulación, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación” (Aguirre-Guzmán, Sánchez-Martínez, Campa-Córdova, LunaGonzález& Ascencio 2009). “Además de la defensa celular los camarones presentan varios componentes plasmáticos que ayuda a la eliminación de agentes patógenos mediante la producción de respuestas de péptidos antimicrobianos, histonas, enzimas lisosomales, lipopolisacáridos, proteínas de reconocimiento a glucanos, bacterinas, respuesta pro fenoloxidasa, y la cascada de coagulación” (Zhen-Ming, Liu, Zhao&Peng 2010). (Fig.1)

Figura 1.- Componentes celulares y humorales del sistema inmune en Crustáceos



FUENTE: Revista AquaTIC, nº 19, pp. 27-33. Año 2003

7.4.4.1 COMPONENTES HUMORALES

“La activación y liberación de las reservas celulares contenida dentro de los hemocitos es gracias a los componentes humorales” Martínez (2007) considera que el primer proceso inmune es el reconocimiento de los microorganismos extraños, estos activan ciertas proteínas que actúan como anti coagulantes de patógenos, reacciones de aglutinación (aglutininas), activación de enzimas (pro fenoloxidasa), péptidos antimicrobianos, bacterinas, inhibidores de proteasas, radicales libres entre otros.

Según Lozano y cols. (2012), “en el Camarón, la respuesta inmune innata se propone sobre la base de los patrones moleculares asociados a patógenos genéricos (PAMP) que pueden ser reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR)”.

Martínez (2007) “considera como componentes humorales a proteínas anticoagulantes, aglutininas, enzima fenoloxidasa, péptidos antimicrobianos y radicales libre. En los camarones, el corazón distribuye la hemolinfa a través de arterias hasta llegar a senos, donde son bañados los diferentes órganos”. Este sistema permite que las proteínas de reconocimiento y los hemocitos tengan una mayor probabilidad de encontrar los elementos extraños. “Por otro lado, la presencia de hemocitos fijos en tejidos como las branquias y la glándula digestiva,

permite una elevada capacidad para aislar los agentes infecciosos en los lugares de mayor contacto con el medio” (Pascual y cols., 2007).

Bower y cols., (1994) y Newman y Bullis (2004) “plantean que los sistemas de defensa incluyen la coagulación de la hemolinfa, melanización, aglutinación celular, mecanismos antimicrobianos, formación de sustancias reactivas del oxígeno y mecanismos fagocíticos”. Entre estos mecanismos, la coagulación de la hemolinfa y la melanización mediada por el sistema fenoloxidasa, además de la aglutinación celular, están directamente inducidos por sustancias extrañas (antígenos), lo que resulta en el sometimiento de los microorganismos invasores que así inmovilizados, son finalmente eliminados por las sustancias antimicrobianas liberadas por la mayoría de los diferentes tipos de hemocitos.

Estas defensas son normalmente activadas por proteínas específicas y moléculas de carbohidratos (lipopolisacaridos, peptidoglicanos y glicanos) de la superficie de bacterias, hongos y agentes protozoarios, que son reconocidos por los hemocitos como extraños (actuando como antígenos). Sin embargo, su habilidad para reconocer virus es limitada, ya que muchos de ellos tienen moléculas superficiales similares a las de las células del hospedero.

Estos antígenos se encuentran formando parte de las paredes celulares de los microorganismos, localizados de la manera siguiente:

Peptidoglicanos (PG): En las paredes celulares de las bacterias Gram positivas.(Fig. 2)

Lipopolisacaridos (LPS): En las paredes celulares de las bacterias Gram negativas. (Fig.2)

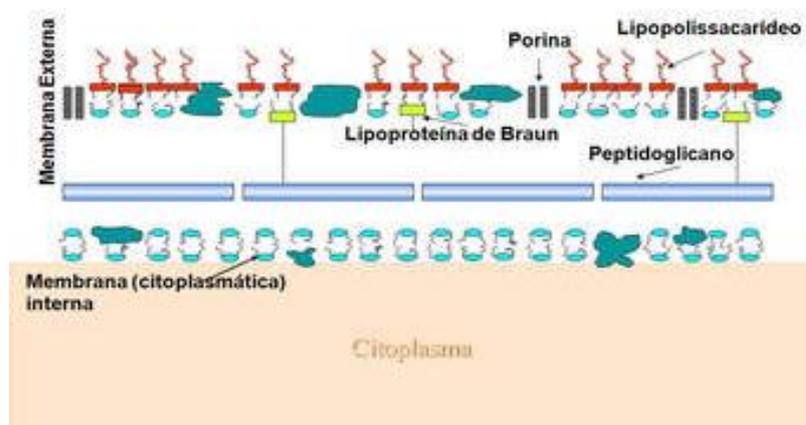


Fig. 2: Pared de celular de bacteria Gram Positiva.

FUENTE: <http://enfermerosmicrobiologos.blogspot.com/2013/04/primer-exposicion-estructura-celular.html>

Según Patrick y Larkin (1995), “las bacterias Gram positivas contienen los **PG** se en su membrana, constituida por una pared que le da forma a la bacteria”. (Espinosa y cols.2002) “las bacterias Gram negativas poseen **LPS** que, activan los sistemas de defensa del huésped causando procesos inflamatorios, aumentando la presencia de hemocitos camarones del género *Litopenaeus*”.

Duvic y Soderhall (1994) y Raa (1996) “refieren que los Beta-glucanos están constituidos por glucosa, enlazados a través de β -1,3- β -1,6; de paredes celulares de hongos y levaduras, respectivamente”.

Según Vázquez y Cols. (1998), “El sistema profenoloxidasa (**proPO**), es activado por enzimas que se encuentran en el interior de los gránulos de los hemocitos granulados y semigranulosos, estos son liberados en cascada en presencia de patógenos externos”. “La desgranulación hace que el sistema proPo sea activado a fenoloxidasa (**PO**), por una serina-proteasa de tipo tripsina (Profenoloxidasa Activating Protein (**ppA**)). La **PO** es quien produce la **melanización** mediante la oxidación de fenoles, causando coloración negra” Fonseca (2010) en el momento que se expresa en cutícula o carapazón de los animales atacados por bacterias, hongos y virus. “Esta respuesta de producción de melanina ha servido para medir la inmunomodulación de patógenos” (Rendon y Balcazar, 2003).

Kurtz, (2005) “considera que a pesar de la consideración de muchos autores de la ausencia de memoria inmunológica en los camarones, algunos estudios revelan que el sistema inmune celular en estos organismos tiene una memoria de corto plazo, aunque no existe homología entre este tipo de memoria y la del sistema inmune adquirido de los vertebrados”.

“En años recientes se ha demostrado que el conocimiento de los procesos inmunológicos asociados a la bioquímica y fisiológica permite determinar el estado de salud de los camarones, las variaciones de la capacidad osmótica y la concentración de los metabolitos plasmáticos han sido utilizadas para determinar el estado fisiológico en relación con la talla, la fase de muda y la presencia de contaminantes, el oxígeno disuelto, la calidad de los reproductores y el tipo de alimentación” (Pascual y cols., 2007).

7.4.4.1.1 PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO PLASMÁTICAS

“La β -1,3-Glucan Binding Protein (BGBP) forman parte de la hemolinfa plasmática de los camarones”. Vargas y cols. (1996) “pueden activar y reconocer proteínas en el sistema inmune de artrópodos” (Söderhäll y Cerenius, 1992) (Vargas y Yepiz, 2000), “ayudando a que procesos de defensa antigénica tales como fagocitosis, melanización encapsulación y coagulación se activen. Otra proteína es la Lipo Polysaccharide Binding Protein (LPSBP) actúa

específicamente en el reconocimiento de los Lipopolisacárido, se considera que tienen capacidad de aglutinar ante presencia de bacterias patógenas” (Vargas y cols., 1996).

7.4.4.1.2. AGLUTININAS

“Son componentes del sistema proPO, responsable de la melanización, la cual acompaña todas las reacciones inflamatorias de los crustáceos y péptidos antibacterianos, como las peneidinas”. (Destoumieux et al. 1997) caracterizó a peneidinas en camarones y evidenció que actúan contra bacterias Gram + y hongos, actuando como opsoninas de bacterias Gram – (Muñoz et al., 2002).

7.4.4.1.3 SISTEMA PROFENOLOXIDASA (proPO)

“Los péptidoglicanos (PG), β -glucanos o Lipopolisacárido (LPS) activan la granulación de los hemocitos (Vázquez y cols., 1998). La actividad de la respuesta proPO ha sido muy estudiada y respaldada, los hemocitos granulados y semigranulosos son los que poseen mayor capacidad de activar este sistema por sus amplios contenidos granulares” (Vargas y Yepiz, 1998) (Sung y cols., 1994., 1996).

7.4.4.1.4 SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

(Destoumieux y cols. 2000) “Los péptidos antimicrobianos se encargan de matar a patógenos bacterianos de tipo Gram positivo y a patógenos fangales. Estas proteínas pueden ser diferenciadas de acuerdo a la composición de sus aminoácidos, estructuras secundarias y similitud de funciones”.

7.4.4.1.5 RADICALES LIBRES Y MECANISMOS ANTIOXIDANTES

“Los radicales libres tales como anionsuperoxidasa (O_2^-) e hidrogeno peroxidasa (H_2O_2), son otra activación del sistema de defensa de los animales frente a patógenos produciéndose una fagocitosis y posteriormente la muerte del patógeno invasor, este reconocimiento incrementa el consumo de oxígeno celular y activa a la NADPH-oxidasa”.(Muñoz et al., 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000 . “Estos radicales libres en combinación con compuestos nitrogenados (óxido nítrico), o lisoenzimas producen la eliminación de patógenos”.(Roch, 1999).

A pesar de su beneficio los radicales libres sufren de una deficiencia debido a que no discriminan entre lo propio y extraño,siendo capaces de causar daño al propio huesped. “La neutralización de esta respuesta inespecifica puede ser regulada o modulada por moléculas antioxidantes como acido ascórbico o vitamina c, ácidos

grasos poli-insaturados y enzimas antioxidantes como la superoxidodismutasa, y peroxidasa” (Dandapat et al., 2003; Campa-Córdova et al., 2002).

7.4.4.2 COMPONENTES CELULARES

El sistema de defensa celular de los crustáceos es responsabilidad directa de los hemocitos. La coloración de los hemocitos en animales sanos se presenta de color celeste, en animales enfermos esta coloración es ligeramente rosada. La coloración de la hemolinfa de animales sanos es responsable la hemocianina que es la proteína respiratoria en los crustáceos.

“El sistema de defensa celular lo constituyen 3 tipos de hemocitos, hialinos, semigranulosos y granulosos. Estas células actúan de acuerdo al tamaño de la molécula invasora activando los diferentes mecanismos de defensa en los animales” (Söderhäll y Cerenius, 1992). Ellos constituyen la fracción celular de la hemolinfa.

7.4.4.2.1 CÉLULAS INMUNO COMPETENTES O HEMOCITOS

“Las células hemocitarias son de tres tipos. Células in gránulos o hemocitos hialinos (H); los hemocitos semi granulosos (SG), con abundantes gránulos; y los hemocitos granulosos (G) totalmente llenos de gránulos” (Johansson y cols., 2000)

“El mecanismo de defensa de los hemocitos también hace que se incrementen las células con radicales libres que estimulan a los hemocitos hialinos a convertirse en hemocitos granulados; así, aumenta el número de granulocitos y, con ello, la tasa de eliminación de patógenos mediante la fagocitosis, encapsulación y melanización” (Destoumieux y cols., 2000).

7.4.4.2 HEMOCITOS HIALINOS

“Los hemocitos hialinos intervienen en el proceso de fagocitosis, coagulación de patógenos, estas células carecen de gránulos y poseen un citoplasma basófilo que contiene un núcleo céntrico. Poseen la capacidad de producir pseudópodos permitiendo su adherencia de manera muy fácil sobre superficies”. (Johansson y Söderhäll, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1992). (Raa, 1996). “Estas células al ser observadas el microscopio de fase no son refringentes a la luz”.

7.4.4.3 HEMOCITOS SEMIGRANULOSOS

“Actúan en el sistema de defensa por fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema proPO (melanización). Presentan un núcleo esférico o en forma de herradura y muchos gránulos redondeada al microscopio de contraste de fases presentan menor refringencia que los hemocitos hialinos. Estos son los

responsables de la producción de péptidos antimicrobianos actuando mucho más eficientemente ante ataques de patógenos” (Dextoumieux y cols., 2000).

7.4.4.2.4 HEMOCITOS GRANULOSOS

“Los hemocitos granulados se caracterizan por ser células muy grandes completamente llenas de gránulos, poseen retículo endoplasmático liso y ribosomas libres en el citoplasma. Sus reservas enzimáticas activan el sistema proPO que se desgranulan cuando son estimulados proteínas fijadoras de compuestos específicos como B-glucanos” (Smith y Söderhäll, 1983).

“Al igual que los hemocitos SG ellos sintetizan y almacenan las peneidinas” (Dextoumieux y cols., 2000), “intervienen además en el mecanismo de encapsulación, tienen mucha refringencia cuando se observa al microscopio de contraste de fases”.

7.4.4.3 MECANISMOS DE DEFENSA A MEDICIÓN CELULAR

7.4.4.3.1 FAGOCITOSIS

En el proceso de fagocitosis, el agente extraño es envuelto e interiorizado dentro de un fagosoma, que luego se funde con las vesículas/gránulos presentes en el

citoplasma. “Una vez unidas las dos estructuras, una variedad de compuestos degradativos y antimicrobianos son liberados en las vacuolas fagocíticas, llevando a la neutralización/degradación de las partículas endocitadas” (Martin et al., 1996). “La fagocitosis de microorganismos fue bien demostrada en diferentes especies de crustáceos” (Hose et al., 1990; Martín et al., 1996; Gargioni y Barracco, 1998; Muñoz et al., 2002).

Aunque todavía existan controversias en la literatura en lo que se refiere a los tipos de hemocitos relacionados con los procesos de fagocitosis en los crustáceos, se sabe que ese mecanismo, extremadamente importante, constituye la primera línea de defensa celular contra la invasión de microorganismos.

7.4.4.3.2 NODULACIÓN

Cuando la cavidad corporal de los crustáceos es invadida por una cantidad masiva de microorganismos o por partículas/patógenos de gran tamaño, cuya fagocitosis no es posible, se desencadena entonces la formación de nódulos y cápsulas celulares, respectivamente. “La formación de nódulos, por otro lado, ocurre alrededor de una gran cantidad de microorganismos invasores, que también son capturados dentro de agregaciones celulares, semejantes a las cápsulas. Esta reacción evita su diseminación y la producción de una septicemia”.(Muñoz et al., 2002).

7.4.4.3.3 ENCAPSULACIÓN

“La encapsulación es la respuesta migratoria de los hemocitos frente a presencia de patógenos grandes como hifas de hongos, nemátodos y determinadas formas de protozoarios para su posterior destrucción”(Muñoz et al., 2002)., “esta reacción no puede ser destruida por los mecanismos humorales” (Vázquez y cols., 1998).

7.4.4.3.4 COAGULACIÓN

“La cantidad de hemocitos libres circulantes en la hemolinfa puede verse afectado durante una infección en diferentes tejidos , disminuyendo su eficacia en la formación de los nódulos y cápsulas. De este modo, nuevos hemocitos requieren ser producidos y liberados en la circulación a partir de los tejidos hematopoyéticos. Estos tejidos presentan una alta tasa de producción celular y son los responsables por la diferenciación y la maduración de los hemocitos que serán liberados en la hemolinfa” (van de Braaket *al.*, 2002a; Söderhället *al.*, 2003). (Johansson *et al.*, 2000; van de Braaket *al.*, 2002a; Söderhället *al.*, 2003; Jiravanichpaisalet *al.*, 2006). “Esos tejidos son generalmente constituidos por lóbulos densos, situados en la región dorsal y dorso-lateral del estómago y del intestino anterior (región epigástrica), así como en la base de los maxilípedos en el caso de los camarones penaeidos” (van de Braaket *al.*, 2002a).

7.4.4.4 INMUNIDAD ADQUIRIDA

“El suministro de lipopolisacáridos, péptidoglicanos, laminarina, y β -glucano) en alimento o aplicados en forma directa (inyección, inmersión, bio-encapsulación, o intubación)” (Vici, Bright, Sing&Bhat 2000). “Pueden ser usados como profilácticos en camarones” (Robles, Sorgeloos, Van Duffel&Nelis 1998).

“En *Fenneropenaeus indicus*, *Penaeus monodon* diferentes tipos de Levaduras como *C. sake*, *C.tropicalis*, *D. hansenii*, *R. rubra*, *R. glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. commune* han sido efectivas en el control de agentes patógenos mediante la activación del sistema inmune en peces (*Channa striata*, *Sparus aurata*)”. (Reyes-Becerril, Tovar-Ramirez, Ascencio-Valle, Civera-Cerecedo, Gracia-López & Barbosa-Solomieu 2008; Sukumaran, Williams, Sajeevan&Rosamma 2010).

“Suplementación de potasio, magnesio y sodio cloruro en dietas prácticas para el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, criado en aguas baja salinidad. No hubo diferencias significativas en la supervivencia y el crecimiento entre los tratamientos la supervivencia entre los tratamientos varió de 79% a 92 %, siendo más baja en los 300 Mg kg⁻¹ Mg⁺² tratamiento y la más alta en el 20g NaCl kg⁻¹ tratamiento. Camarones criados mediante la dieta basal aparece el menor peso ganar 784,7 %, mientras que los camarones procedentes de los tratamientos de 10g NaCl kg⁻¹ (954.3%) y 10g K⁺ kg⁻¹ (917.1%) tuvo el

aumento de peso mayor. Camarón ofreció la dieta basal mostró la menor media 4,49 g de peso individual aunque los valores no fueron estadísticamente diferentes entre otros tratamientos ($P > 0.05$)” L. A. Roy, D. A. Davis, I. P. Saoud & R. P. Henry, 2007

“No hubo diferencias significativas en el aumento de peso o la supervivencia por ciento entre los tratamientos en el ensayo 2, aumento de peso y supervivencia de *L. Vannamei* criado en agua de baja salinidad artificial alimentado con dos dietas experimentales suplementadas con K^+ Mg^{+2} y $NaCl$ ”. L. A.ROY, 2007

El Dr. Richard Murphy “nos habla acerca del estudio de la quelatación de los minerales nos informa que existe muchas formas de complejos metálicos disponibles en el mercado para el uso en nutrición animal a los cuales se las nombra como metales trazas orgánicos en virtud que son complejos o están asociados a moléculas orgánicas. La química ha generado una confusión en la industria del alimento animal porqué se los nombra como complejos metálicos con aminoácido de polisacáridos, sin embargo esas definiciones son de poca ayuda”.

En términos generales se puede usar para describir las especies que se forman cuando un ion metálico reacciona con una molécula o ion (ligado) que contiene un átomo con un solo par de electrones. Los ligados que solamente contienen un

átomo donante se llaman monodentados mientras los que contienen dos o más átomos donantes forman un enlace con un ion metálico y se denomina bi-tri o tetradentados también se pueden llamar polidentadas. Hay recordar que aun cuando los quelatos son complejos, no todos los complejos son quelatos. En muchos casos los quelatos que se forman entre un metal y di o tri-péptidos tendrán mayor estabilidad que un complejo formado por la reacción de un solo aminoácido con el mineral (metal).

Cada aminoácido muestra un rango de constantes de estabilidad cuando forma complejos con un mineral y esto puede evaluarse en diversas bases de datos sería razonable que los péptidos tengan un mayor número de átomos donantes para formar una serie de anillos quelatados estas tendrían mayor estabilidad que los aminoácidos simples tales como la glicina. Las investigaciones llevadas por Alltech en el Centro Europeo de Biociencias han demostrado que la producción de un hidrolizado de proteína óptimo para la quelación de minerales se puede lograr mediante una minuciosa selección de las condiciones de la hidrolisis por lo cual garantiza que el rango de minerales Bioplex tendrán las propiedades físico-químicas necesarias para garantizar un amplio rango y estabilidad del enlace mineral bajo condiciones de pH cambiantes.

7.5 MINERALES

Los minerales inorgánicos son nutrientes que cumplen funciones estructurales en el organismo, como la reconstrucción de tejidos, interviniendo también en otros variados procesos enzimáticos, en la contracción muscular, la coagulación sanguínea, reacciones del sistema nervioso, etc. Para el correcto funcionamiento del organismo, deben ser ingeridos a través de la dieta diaria.

A diferencia de las vitaminas que pueden ser fácilmente destruidas, los minerales son elementos inorgánicos que siempre mantienen su estructura química. “Los camarones pueden absorber minerales del agua circundante aunque necesitan de una fuente dietética que le suministre ciertos minerales para el crecimiento, debido a pérdidas durante la muda” (Saoud et al., 2003).

7.5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS MINERALES

Macroelementos minerales o Macrominerales: calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, cloro, azufre.

Los microelementos o trazas, son minerales o sustancias inorgánicas necesarias en el organismo en cantidades muy pequeñas, pero que no obstante resultan esenciales para conservar la salud. “No se han determinado con exactitud las

funciones de los microelementos en el organismo, pero sí se han descrito las disfunciones o enfermedades que pueden acarrear su carencia” (Saoud et al., 2003)

**TABLA 2: CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS ELEMENTOS
MINERALES ESENCIALES**

MACROMINERALES	MICROMINERALES
CALCIO	COBRE
MAGNECIO	MANGANESO
POTASIO	SELENIO
SODIO	ZINC

Shiau Shi Yen and Hsieh Jia Fen 2001.

7.5.2 FUNCIÓN DE LOS PRINCIPALES MINERALES

Los minerales son considerados coenzima que ayuda a que las actividades celulares empleen menor energía para sus funciones, proporcionando protección a los tejidos del organismo. Se las relaciona con la coagulación de la sangre, la contracción de los músculos y en diversas reacciones nerviosas.

“Uno de los factores de mayor importancia en el desarrollo del camarón, se encuentra la relación adecuada en la concentración de los iones en el agua de mar, debido a que esto se ha asociado con la sobrevivencia de este crustáceo” (Saoud et al., 2003). “El agua de mar utilizada para el cultivo de estos organismos tiene diferente composición iónica y el camarón debe poseer la habilidad para mantener su capacidad osmoreguladora” (Roy et al., 2007; Jiang et al., 2000).

Sin embargo, existe inconsistencia en la información publicada referente al efecto de la temperatura, la salinidad y la concentración de iones minerales (Mg, Ca y K) con la frecuencia de mudas, sobrevivencia y desarrollo óptimo para la especie *Litopenaeus vannamei*.

En juveniles de *L. vannamei* se ha observado, que se requiere un mayor gasto energético para mantener un metabolismo y equilibrio osmótico adecuado cuando

los organismos son cultivados en aguas con salinidades de 40 ‰, mientras que los camarones cultivados en medios acuáticos con salinidad baja, realizan un esfuerzo mínimo para mantener un equilibrio osmótico entre los fluidos corporales y el medio externo, optimizando sus procesos fisiológicos de tal manera, que el ahorro energético puede ser destinado al crecimiento del organismo.

“A una salinidad de 26 ‰ los juveniles de *L. vannamei* utilizan la menor cantidad energética para cubrir sus procesos metabólicos” (Valdéz et al., 2008).

“La composición iónica del agua es un factor importante e influyente en los procesos metabólicos de los animales en cultivo” (Spotte, 1979); en este sentido, McGraw y Scarpa (2002), “indicaron que niveles bajos en la concentración de los iones Na, K, Ca y Mg en el agua disminuyen la sobrevivencia del camarón *L. vannamei* en contraste con altas concentraciones de estos iones”.

7.5.3 COBRE

Se piensa que el cobre es también indispensable para la formación de pigmentos. “Este mineral es absorbido, la disponibilidad en el cuerpo de los organismos y su concentración está relacionada con la presencia de fitatos, también por el

incremento de los minerales Zn, Fe, Mo, Cd, y los compuestos de carbonato de calcio y sulfatos inorgánicos” (Saoud et al., 2003).

En el caso de los camarones el cobre es el principal elemento en la captación del oxígeno molecular, también se encuentra en la mayoría de los anticuerpos principales efectores de la respuesta inmune de vertebrados. Siendo la vitamina C considerado como un antioxidante y anti estresante, la presencia del cobre ayuda a una mejor asimilación y protección en procesos de cura de los animales.

Aporte mínimo recomendado: 34 mg/kg (Davis *et al.* 1993)

7.5.4 MANGANESO

Una de sus funciones principales es la de catalizar a las enzimas, es fundamental en la estructuración de los huesos como por ejemplo sintetizar (mucopolisácaridos), renovar la sangre, en el metabolismo de hidratos de carbono carbohidratos y la reproducción.

El manganeso activa las enzimas fosfato tranferasas y fosfato deshidrogenasas principales precursores del grupo fosfato.

“El manganeso se reduce en presencia de fitatos, así como por una elevada ingesta de calcio” (Saoud et al., 2003) su absorción es, a través de branquias, aletas y piel de peces y crustáceos, permite la absorción de absorción de vitamina B1, biotina, vitamina C y colina. Es un componente del sistema nervioso.

7.5.5 SELENIO

Aplicado con la vitamina E actúa como protector ante estrés oxidativo en las paredes de las membranas, es un elemento primordial en la acción del glutatión peroxidasa.

“El selenio participa en la biosíntesis de ubiquinona (coenzima Q), se lo encuentra disponible en solubles y harinas de pescado, (5-2 mg/kg Se); levadura de cerveza, harina de gluten, de maíz, de nabo, de algodón (2-1 mg/kg Se); levadura, y granos secos, sub productos de aves, harina de carne y de alfalfa (1-0.5 mg/kg Se). El selenio es del agua en diferentes organismo acuáticos” (Saoud et al., 2003).

Aporte mínimo recomendado: 0.2-0.4 mg/kg (Davis 1990).

7.5.6 ZINC

En el tracto gastrointestinal se absorben por medio de las branquias, piel y aletas en crustáceos y peces. Ofrecida su asimilación en la dieta pero puede ser reducida por fitatos o la adición alta de calcio, fósforo y cobre.

Fuentes: crustáceos, levadura de cerveza, germen de trigo, huevos y leche.

Aporte mínimo recomendado: 33 mg/kg (Davis *et al.* 1993)

Tabla 3: Requerimientos manual para dietas comerciales de camarón

Mineral	Cant./Kg de alimento
Calcio	máximo 2.3 %
Fósforo-disponible	0.8 %
Fósforo-total	1.5 %
Magnesio	0.2 %
Sodio	0.6 %
Potasio	0.9 %
Hierro	300 ppm
Cobre	35 ppm
Zinc	110 ppm
Manganeso	20 ppm
Selenio	1 ppm
Cobalto	10 ppm

(Liñan Giraldo, Wilbert. 2007)

7.5.7 ABSORCIÓN DE MINERALES EN CRUSTÁCEOS

Los desbalances minerales particularmente de los macroelementos, pueden afectar la reproducción de los crustáceos de dos maneras. Primeramente, causando un estrés fisiológico marcado por la reabsorción de los oocitos y por otro lado reduciendo condiciones reproductivas de los reproductores: causando desbalance electrolítico, induciendo a un estrés osmoregulatorio y a una consecuente deshidratación, pérdida del apetito, alteración del metabolismo y una pareja función respiratoria y excretora. “La segunda forma es un efecto directo de la mala nutrición con minerales, alterando la calidad de los huevos, y como resultado se observa un impacto en la embriogénesis y viabilidad de la larva” (Dr. Ronan Power, 2004).

“El camarón como la mayoría de los organismos acuáticos es capaz de absorber o excretar los minerales contenidos en el agua a través de las branquias, por lo que los requerimientos de minerales desprenderán grandemente de la concentración de estos en el medio acuático”. (Akiyama *et al.*, 1993).

7.5.8 MINERALES ORGÁNICOS.

En especies acuáticas estas funciones incluyen procesos de formación y desarrollo del esqueleto, a nivel celular a la respiración y equilibrio ácido-base.

Son de gran importancia los componentes hormonales y enzimáticos.

Niveles de nutrientes	Niveles de nutrientes recomendado para camarones carnivoros					
	Larva	PLI-25	PL25lg	Juvenil	Engorda	Reproductor
<u>Principales minerales, %</u>						
Magnesio, % min.	0.18	0.15	0.13	0.10	0.08	0.13
Minerales traza, mg/Kg min.						
Zinc	120.00	110.00	100.00	90.00	80.00	120.00
Manganeso	60.00	55.00	50.00	45.00	40.00	60.00

Cobre	12.00	11.00	10.00	9.00	8.00	12.00
Selenio	0.25	0.23	0.21	0.19	0.15	0.25

Tabla 4. Requerimiento mineral según N.R.C (National Research Council 2001)

8. MARCO METODOLÓGICO

8.1 ÁREA DE ESTUDIO

La investigación del bioensayo se realizó en los laboratorios de acuicultura del centro Nacional de acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL), en la comuna de “San Pedro” de la parroquia Manglaralto de la Provincia de Santa Elena. A 170 Km de Guayaquil, Latitud $1^{\circ}57''$ y longitud Este $80^{\circ}43''$ (ver Foto 1)



FOTO 1. Ubicación geográfica del CENAIM

8.2 MATERIALES Y EQUIPOS.

8.2.1 MATERIALES

- Acuarios (54) capacidad 50L
- Aireador (54)
- Codos (12) 1 pulgada.
- Esferográfico
- Malla
- Tubo (3) de 1 pulgada.
- Llave de agua (3) 1 pulgada.
- Llave de agua (54) ½ pulgada
- Libreta de apuntes
- Mallas
- Manguera ½ pulgada.
- Manguera 3/16 para aireador
- T (12) 1 pulgada.

- Esferográfico
- Piedras difusoras

8.2.2 EQUIPOS UTILIZADOS

- Autoclave LLAMATO Sterilizer SN 510
- Balanza Analítica METTLER AE 240
- Cámara de Flujo Laminar AIR TECH
- Cámara de Flujo LABCAIRE
- Centrifuga Eppendorf refrigerada
- Congelador -20 REVCO
- Espectrofotómetro de absorción atómica en llama (FAAS). Perkin Elmer 3110
- Espectrómetro de Absorción Atómica SOLAAR 969 Thermo Elemental
- Hemocitómetro (Cámara de Neubauer)
- Lector de Microplaca MULTISKA EX
- Lámparas de cátodo hueco de Zn, Cu, Mn y Se

- Microscopio Óptico de contraste de fases de (Olympus BH2, objetivo A20 PL)
- Secador de material ADVANTEC EP-300 LABORATORY GLASSWARE DRYER
- Termómetro

8.2.3 REACTIVOS

- Ácido Clorhídrico concentrado
- Ácido Nítrico concentrado
- Ácidos calidad ultra pura: HNO₃, HCl, HClO₄.
- Ácido L-Ascórbico
- Agua destilada
- Borohidruro de Sodio
- Cacodilato de Na
- Citrato de sodio al 10 %
- Cloruro de calcio
- Cloruro Magnesio

- Hidróxido de Sodio
- Hidróxido de Potasio
- Metanol al 70 y 100%
- Soluciones patrones comerciales de 1000 ppm de Zn, Cu, Mn y Se con certificados trazables a NIST.
- Yoduro de Potasio

8.2.4 VIDRIERÍA

- Beakers de 50, 100, 250 y 1000 ml
- Erlenmeyer de 125 mL
- Material volumétrico clase A.
- Matrices aforados de 50, 100, 200 y 1000 mL
- Pipetas volumétricas de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 y 50 ml
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Probetas de 200 mL

8.3 METODOLOGÍA

8.3.1 MÉTODO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS DIETAS.

Las dietas se elaboraron siguiendo el procedimiento del manual de técnicas para nutrición acuícola (Molina y Paredes, 1997). Los ingredientes fueron mezclados de menor a mayor concentración y a esta mezcla homogénea, se le adiciona agua destilada entre 40-50%. La mezcla semi-húmeda paso por una pequeña peletizadora que tenía una matriz con orificios de 2mm de diámetro. Los pellets con una longitud de 4-6mm fueron secados (95°C) por 90 min. Y finalmente almacenados en fundas con sello hermético a -20 °C.



Foto 2. PELLET DE LA PREMEZCLA CON MINERALES

8.3.2 SIEMBRA Y LEVANTE DE POBLACION EXPERIMENTAL

Para dar inicio al experimento las larvas de camarón fueron donadas en una camaronera de la parroquia El Morro de la Provincia del Guayas, realizando su traslado al Centro Nacional de Acuicultura e investigaciones Marinas (CENAIM), pero no se logro adaptar esta población a las condiciones del laboratorio y la mortalidad alcanzo el 90 %, las causas de la alta mortalidad se especula a problemas de logistica y oxigenación por la alta densidad puesta en el tanque de recepcion, lo que causo estres en los organismos.

Para superar este inconveniente se pudo obtener larvas en estadio p12 procedente desde Mar Bravo-Salinas hasta la camaronera del CENAIM-ESPOL (PALMAR) se alimentaron con balanceado al 35% (GISIS), se los aclimato por un lapso de 30 dias hasta llegar al peso ideal para el bioensayo, que se establecio en 1 gramo promedio, luego de esto se realizo el levante de los juveniles de 1 g y fueron transferidos hasta el centro de investigación de acuicultura del CENAIM-ESPOL (SAN PEDRO) A la siembra de los camarones se estableció tener un coeficiente de variación no mayor al 10%.

Aqui estos juveniles fueron aclimatados por 8 dias en tanques cilindricos de 10 Ton., luego de esto fueron transferidos a las gavetas de 50 L dentro del set

experimental, en estas se colocaron 10 camarones en cada una. Los parámetros que se monitorearon durante el bioensayo fueron realizados antes de realizar el sifón de las heces y el alimento sobrante.

8.3.3 PROTOCOLO DE TRABAJO

8.3.3.1. UNIDADES EXPERIMENTALES

Las gavetas tienen la capacidad de 50 L fueron distribuidos de manera aleatoria para cada tratamiento que se evaluara durante los 90 días, las gavetas y los tratamientos fueron sorteados y de manera aleatoria distribuidos en el set de bioensayo, las que fueron rotuladas e identificadas para tener una claridad de los tratamientos que se incluirían en las mismas. Se utilizaron 54 gavetas de 50 litros de capacidad, y en cada una se colocaron 10 camarones 1g.



Foto3. SET EXPERIMENTAL CENAIM-ESPOL (GAVETAS)

8.3.3.2 DENSIDAD DE SIEMBRA

La densidad de la siembra fue de 10 camarones por acuario. Durante los primeros 8 días se cambiaron los camarones muertos para mantener la densidad inicial, los cuales fueron alimentados solo con el alimento control. Estos animales para la siembra serán medidos de manera individual para mantener la homogeneidad de los pesos en el arranque de la prueba.

8.3.3.3 TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Bajo la inclusión tradicional de inclusión de Harina de Pescado (HP) en la dieta, se buscó una reducción del 50% y 0%; y dentro de ellas, se evaluó el uso de Mineral Inorgánico (MI) o Mineral Orgánico (MO). La consideración de reducción del 50% de MI en las diferentes concentraciones de harina de pescado (100%,50% 0%); en esta prueba no fue considerado importante por encontrarse por debajo de los requerimientos minerales necesarios para el camarón *Litopenaeus vannamei*.

	% Harina Pescado								
	0			50			100		
Minerales	100%	100%	50%	100%	100%	50%	100%	100%	50%
	MI	MO	MO	MI	MO	MO	MI	MO	MO

8.3.3.4 BIOENSAYO

Los tratamientos determinados serán:

- 1) 0% HP+ 100% MI
- 2) 0% HP+ 100% MO
- 3) 0% HP+ 50% MO
- 4) 50% HP+ 100% MI
- 5) 50% HP+ 100% MO
- 6) 50% HP+ 50% MO
- 7) 100% HP+ 100% MI
- 8) 100% HP+ 100% MO
- 9) 100% HP+ 50% MO

Tabla 5. Composición porcentual de las dietas del ensayo

Composición	A	B	C	D	E	F	G	H	I
HARINA DE PESCADO				7.5	7.5	7.5	15	15	15
BENTONITA	2.83	2.83	2.88	2.63	2.63	2.63	1.9	1.9	1.93
PASTA SOYA	41.2	41.2	41.2	30.1	30.1	30.1	18.1	18.1	18.1
TRIGO	38.3	38.3	38.3	42.4	42.4	42.4	48.1	48.1	48.1
ACEITE PESCADO	3.4	3.4	3.4	3	3	3	2.5	2.5	2.5
METIONINA	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
AFRECHILLO	2.9	2.9	2.9	2.8	2.8	2.8	3	3	3
POLVILLO DE ARROZ	2.9	2.9	2.9	3	3	3	3	3	3
HNA. CALAMAR	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
SOLUBLES PESCADO	2	2	2	2	2	2	2	2	2
FOSFATO MONODICAL.	2	2	2	2.1	2.1	2.1	2	2	2
PREMEZCLA DE VITAMINAS	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
Premix minerales INORGANICO	0.1			0.1			0.1		
Premix minerales ORGANICO		0.1	0.05		0.1	0.05		0.1	0.05
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Al finalizar la evaluación experimental, los camarones fueron contados y pesados en una balanza digital de 0.01g de precisión. Se calcularon los indicadores de respuesta nutricional: Peso medio final de los organismos (Pf); Ganancia en peso (GP), Factor de conversión del alimento (FCA) y supervivencia (S).

8.3 .4 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

8.3.4.1 PARÁMETROS PRODUCTIVOS

- ✓ Supervivencia (%):

Es la diferencia porcentual de los animales sobrevivientes al final del ensayo

- ✓ Consumo de Alimento:

Es la cantidad de alimento ingerido

- ✓ Incremento de Peso

Es la diferencia del peso final obtenido menos peso inicial.

- ✓ Biomasa

- ✓ Conversión alimenticia

Es el coeficiente de la cantidad de alimento consumido versus el peso obtenido de los animales.

8.3.4.2 PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y ANALÍTICOS

- ✓ Contenido mineral en exoesqueleto

- ✓ Se analizó contenido de Se, Cu, Mn, Zn.

8.3.4.3 PARÁMETROS INMUNOLÓGICO

Se analizó número de Hemocitos, actividad pro Fenoloxidasa, actividad bacteriana, y proteína plasmática.

Los análisis inmunológicos se establecieron al final del bioensayo, donde se trabajaron de manera individual tomando hemolinfa de 5 animales de 4 réplicas de los 9 tratamientos en los hemogramas , identificando a los hemocitos hialinos, granulados y semi granulados. . Para los otros análisis inmunológicos tales como proteína plasmática y anión súper oxido, se trabajaron con pool de hemolinfas de 5 animales para los 9 tratamiento de las 6 réplicas totales empleadas. Para la prueba inmunológica de la profenoloxidasa se analizaron las hemolinfas en pool de 5 animales de los 9 tratamientos y 3 réplicas del bioensayo.

8.5 ALIMENTO

Los Balanceado antes mencionados son peletizados y son elaborados por EXPALSA los cuales contienen el 35% y 28% de proteína solo el alimento control se puso durante los 8 días de aclimatación en los acuarios.

Se mezcló pesando los ingredientes de menor peso primero hasta ver homogeneidad y se puso poco a poco el de mayor peso y así sucesivamente hasta tener una masa con todos los ingredientes secos, los líquidos se colocaron con una pequeña cantidad de masa seca para mezclar bien y de ahí se fue incorporado de a poco el resto de la masa seca. La masa húmeda se pasó 2 veces por el molino de carne para obtener los fideos que luego se sacaron en la estufa.

Tabla 6. Porcentaje en mg/kg de los minerales en el alimento

Nutrientes	mg/kg Premezcla
MANGANESO (Mn)	10.000
SELENIO (Se)	200
ZINC (Zn)	32.000
COBRE (Cu)	32.000

Fuente: Molina C.

Al incluirse en el alimento la concentración final de minerales fue de 10; 0,2; 32; 32 mg/kg de alimento que es el requerimiento establecido en camarón usando fuentes inorgánicas de ahí que algunos argumentan que en forma orgánica el requerimiento de los minerales es menor por que al estar bajo la forma orgánica el mineral no se quela con el ácido fitico presente en ingredientes vegetales.

8.5.1 PERIODO DE ALIMENTACIÓN

Se alimentó *ad libitum* con balanceado de 35% de proteína, suministrado a razón del 6% de la biomasa dos veces por día (10h00 y 16h00). La cantidad de alimento suministrada por acuario se registró todas las semanas hasta el final del ensayo, esto nos permitirá estimar el Factor de Conversión Alimenticia de la prueba.

La ración diaria fue distribuida dos veces al día a las 10 AM y a las 16 PM, lo que incrementando en gramos a medida que aumentaba la biomasa.

8.5.2 PARÁMETROS FÍSICO DEL AGUA.

Durante el bioensayo se realizaron estas medidas una veces al día en la mañana respectivamente antes de cada recambio de agua estos parámetros medidos

fueron: oxígeno disuelto, temperatura, salinidad. En la bitacora se registraron los parámetros físicos: temperatura, oxígeno, La temperatura y oxígeno disuelto del agua OD +/- 3mg/L., fueron registrado diariamente en la mañana (oxímetro YSI-58 con precisión de 0.01 mg/L y 0.1°C, potenciómetro Toa HM-18ET de 0.01 U de precisión). Salinidad 27ppt, T° 28C, y pH 8.

8.5.3 RECAMBIO DE AGUA

Desde el primer día hasta el final del bioensayo se realizo el recambio de agua por medio de flujo al 1000%. diariamente esto fue controlado.

8.6 PROTOCOLO PARA MINERALES

La determinación de Se, Mn, Zn y Cu se basa en el método de absorción atómica horno de grafito. Es un método instrumental que está basado en la atomización del analito en matriz líquida y que utiliza comúnmente un nebulizador pre-quemador (o cámara de nebulización) para crear una niebla de la muestra y un quemador con forma de ranura que da una llama con una longitud de trayecto más larga. La niebla atómica es desolvatada y expuesta a una energía a una determinada longitud de onda emitida por una Lámpara de Cátodo hueco construida con el mismo analito a determinar.

Para determinar la concentración del analito se mide la intensidad de la luz que llega a un detector, lo que permite determinar, por diferencia, la cantidad de luz que ha absorbido la muestra, y mediante la recta de calibrado, la concentración del analito.

8.6.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Para llevar a cabo la determinación de Se, Mn, Zn, Cu, se dispone de un volumen aproximado de 10 a 20 gr. de la muestra de músculo de camarón en un tubo de ensayo. Se prepara también un blanco y una única disolución patrón, ya que el equipo realiza las diluciones necesarias para la obtención de la curva de calibrado.

Una vez se han preparado las muestras, se colocan en el equipo y se lleva a cabo el análisis.

Las longitudes de onda que emiten las diferentes lámparas se muestran en el siguiente ítem.

Longitudes de onda emitidas por las Lámparas de Cátodo hueco para la determinación de Mn, Se, Zn, Cu, en muestras de agua.

	Mn	Se	Zn	Cu
λ (nm)	279,4	198.2	13,9	404,5

8.7 PROTOCOLO PARA LAS PRUEVAS INMUNOLOGICAS

8.7.1 CUANTIFICACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO (O₂⁻) POR REDUCCIÓN DEL NBT

Este radical de oxígeno se cuantifica por medio de la técnica de reducción del NBT, siguiendo el protocolo optimizado por Muñoz *et al.* (2000).

Se depositaran 50 μ L de hemolinfa de camarón y en cada pozo de la microplaca de tipo Elisa (96 pozos), se llena por triplicado para la actividad de Base (AB) igual para la Estimulación (St), dando un total de 6 pozos, es decir un volumen de 300 μ L por muestra.

Luego se realizó un cultivo adicionando 50 μ L de Solución de Hank's (Gibco) 3X a todos los pozos, a 25 °C por 45 min.

Transcurrido este tiempo de incubación, las células se habrían fijado en el fondo de los pozos y se retirara suavemente el sobrenadante por medio de una pipeta multicanal, luego adicionaron 50 μ L de las distintas diluciones de Hank's 2X con el producto a analizar, en todos los pozos del cultivo primario.

Al triplicado para Actividad Base se le agregó 50 μ L de Solución de Hank's 3X.

Al triplicado para St se le agregara 50 μ L de una solución de Zymosan ($1,43 \times 10^8$).

A todos los pozos se les adicionará una solución de NBT al 0,30% en Hank's 1X, y se dejara incubar por 2 h, cubiertos y protegidos de la luz.

Transcurrido este tiempo, se retirará el sobrenadante y se procedeara a realizar 3 lavados:

- El primero con 200 μ L de metanol al 100%, dejó por 3 minutos, retiró
- El segundo con 200 μ L de metanol al 70%, dejó por 3 minutos, retiró
- El tercero con 200 μ L de metanol al 70%, dejó por 3 minutos, retiró

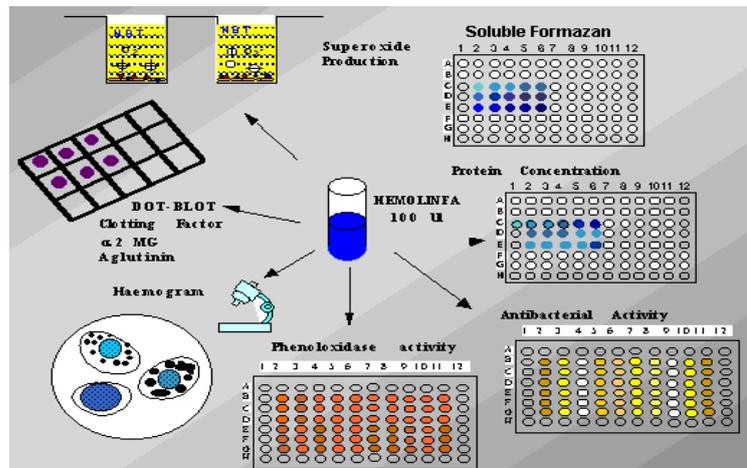
Después de estos lavados se dejara secar la microplaca por 30 minutos, para luego poner 140 μ L de DimetilSulfoxide DMSO en cada pocillo.

Se colocará 120 μ L de Hidróxido de potasio KOH 2M en cada pocillo (se tornara de color turquesa los pocillos debido a la disolución del formazán)

Finalmente, la placa se llevara al lector de microplacas y realizara la lectura a $\lambda=620$ nm.

La producción de O_2^- es expresada en tasas. La tasa se obtiene dividiendo el valor promedio de la absorbancia de la muestra estimulada para el valor promedio de la absorbancia de la misma muestra sin estimulación.

Las soluciones de Hank's 3, 2 y 1 (Sigma) se refieren a las concentraciones de Mg y Ca, (26 mM de Cl Mg y 12 mM de Cloruro de Calcio, 13mM de Cloruro de Magnesio y 6 Mm de Cloruro de Calcio, respectivamente.



**Fig. 3. CUANTIFICACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO (O₂⁻) FUENTE-
CENAIM Laboratorio de Inmunología**

8.7.2 ACTIVIDAD PRO FENOLOXIDASA (PO)

Esta prueba se analizó mediante el protocolo descrito por Muñoz *et al.* (2000) para el fácil conteo de hemocitos en la muestra de hemolinfa, mantener con un buen aspecto morfológico para evitar la agregación celular, se unió 10ul de hemolinfa total en 10ul de formaldehído al 37%.

Se procedió a colocar 10 µl de la muestra tratada con formaldehído en el hemocitómetro (Cámara de Neubauer, Erma), para determinar el número y los tipos hemocitos en un microscopio óptico, provisto de un dispositivo de contraste de fases (Olympus BH2, objetivo A20 PL).

Luego se cuantificaron las concentraciones de hemocitos en la muestra, para después centrifugar la muestra de hemolinfa por 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) y a 5°C. Se resuspende el precipitado a razón de $10 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ en tampón cacodilato de sodio (Cac.) 10 milimolar, se centrifuga por 3 minutos a 12000 (rpm) a 5°C. El sobrenadante resultante se almacena a -20°C por no más de una semana, para su respectivo análisis

Esto se distribuyó por triplicado 50 μl del líquido sobrenadante (contenido celular de hemocitos) en cada hoyo de una microplaca de 96 hoyos. Un triplicado con Laminarina y un triplicado sin Laminarina.

Después se adiciona 50 μl de solución del producto, para las soluciones sin Laminarina constituida por:

-Cacodilato de Na 10 mM, pH 7;

- Cl_2Ca 1M;

-Agua destilada

-Producto a analizar

Para las soluciones con Laminarina:

-Cacodilato de Na 10 mM, pH 7;

- Cl_2Ca 1M;

-Agua destilada

-0,2% de Laminarina.

-Producto a analizar

Dejar incubar por 77 minutos a Temperatura ambiente

Transcurrido este tiempo se coloco 50 μl de L-Dopa (3 mg de L-Dopa en 1 ml de tampón Cacodilato 10 mM) para luego incubar por 10 minutos a temperatura ambiente protegida de luz.

Esta concentración del metabolito resultante se determino mediante la absorbancia leída en el lector de microplacas a una longitud de onda 490 nm.

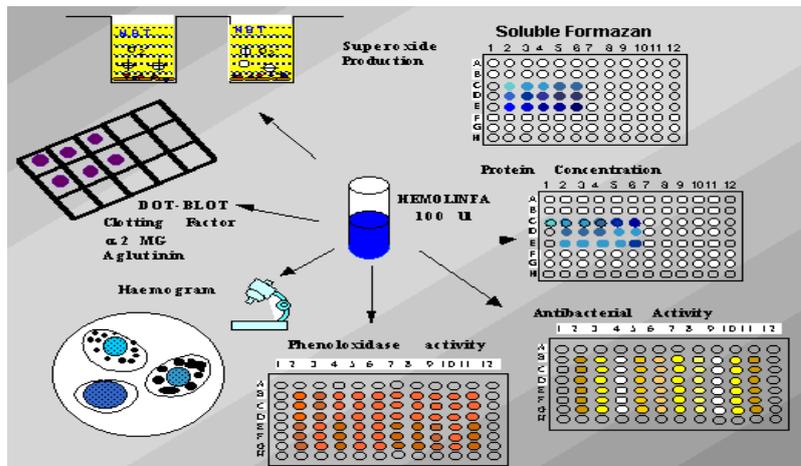


Fig. 4: ACTIVIDAD FENOLOXIDASA (PO) FUENTE- CENAIM
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

8.7.3 PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY

Se realizo la curva estándar: 0,2,,4,6,8,10,12,14,16,18,20µl con BSA (1ug/µl), y se completo a 20 µl con agua destilada

Diluir 1/50 la muestra de plasma (10 µl en 490 µl de agua destilada).

Llenar la placa por duplicado,

-Agregar 20 µl de solución mezcla.

- 909 µl de solución A
- 45,5 µl solución B
- 45,5 µl solución C

-Incubar 15 minutos

-Colocar 60 μ l/hoyo de solución Folin diluida 1/10 en agua destilada

-Después de 30 minutos leer en el espectrofotómetro ($\lambda= 540$ nm).

Solución mezcla:

A: 100g de Na_2CO_3 diluido en Na OH (0,5 N) hasta completar 1 litro

B: 1 g $\text{Cu SO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$ llevada a 100 ml con agua destilada.

C: 2 g K tartrato de sodio y potasio llevado a 100 ml con agua destilada.

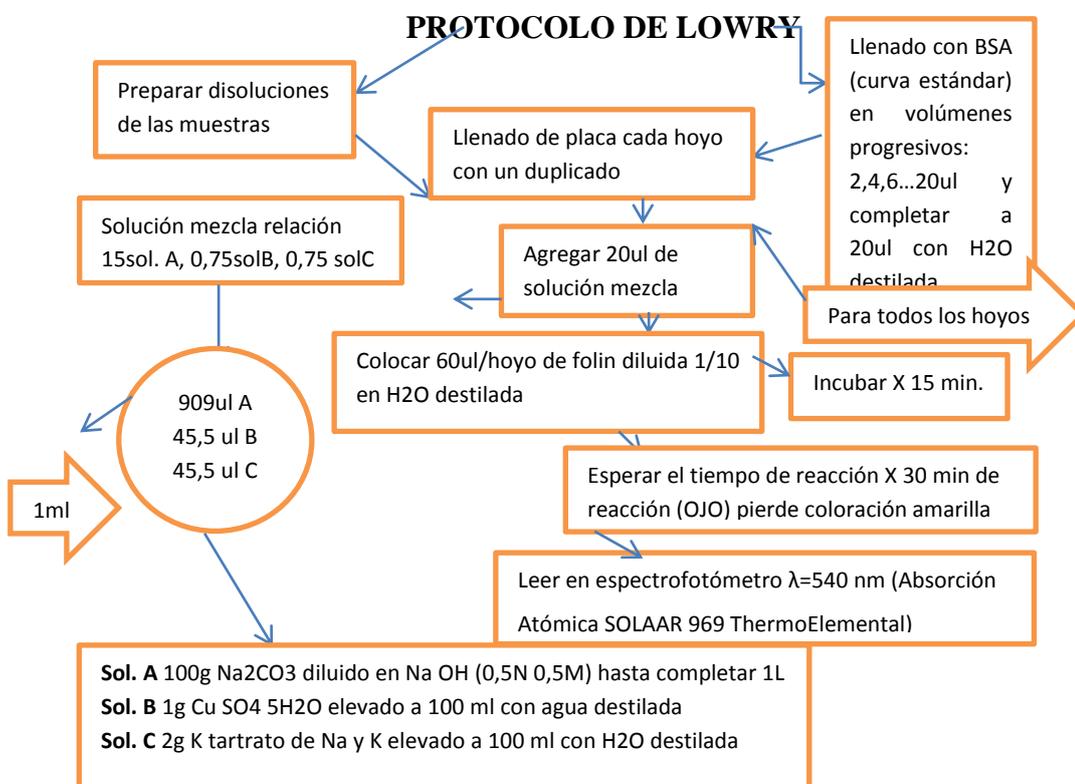


Fig. 5. Protocolo de LOWRY (Proteínas Plasmáticas)

8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante comparación de medias a través cuadros de diálogos antiguos (Diagrama cajas y gráficos lineales), para establecer su normalidad se utilizó pruebas de estadísticos descriptivos gráficos de Q-Q. Adicionalmente los resultados del análisis es procesado por Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor ($p < 0,05$) y Fisher del software IBM SPSS Statistics versión 20.

9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

9.1 HEMOCITOS TOTALES

“En el camarón la circulación hemocitos juegan un papel importante en la inmunidad innata. Muchas moléculas de defensa humorales están contenidos en los gránulos de hemocitos y la liberación de los que se estimula por invasión de patógenos” (Johansson et al. 2000).

Se analizaron 9 tratamientos con tres dietas harina de pescado, minerales orgánicos e inorgánicos en diferentes concentraciones, en el cual detallamos los tratamientos con mejores resultados con la presencia de Hemocitos donde HH en porcentajes (37,08%) se determinaron en el tratamiento H; mientras que en

el T-G se obtuvo (60.44%) de HS y para HG en el T-A (9.6%), además se indica el conteo por tipo de Hemocito en las dietas y tratamientos, ver Tabla 7.

Aunque Prieto *et al.* (2005) “adicionó en los diversos tratamientos ajo y extractos de plantas, cuyo conteo de hemocitos fue superior en T1 al obtener $41,07 \pm 7,56 \times 10^5$ cel/ml para el siguiente caso el T2 ($35,29 \pm 9,25 \times 10^5$ cel./ml) obtuvo el conteo más bajo, la variación de los resultados obtenidos no indica una diferencia significativa”.

Trat	HP	MI	MO	N°	Hemocitos				Porcentaje Hemocitos		
					Hialinos	Semigranulosos	Granulosos	Totales	Hialinos	Semigranulosos	Granulosos
A	0	100	0	1	7,040,000 ^{abc}	11,800,000 ^{ab}	2,090,000 ^a	21,000,000 ^{ab}	33,807 ^a	56,582 ^b	9,610 ^a
B	0	0	100	2	7,170,000 ^{abc}	10,800,000 ^{ab}	1,580,000 ^b	19,600,000 ^{ab}	36,210 ^a	55,720 ^b	8,073 ^b
C	0	0	50	3	8,220,000 ^{ab}	12,500,000 ^a	1,280,000 ^{bc}	22,000,000 ^a	37,257 ^a	56,889 ^b	5,854 ^c
D	50	100	0	4	7,360,000 ^{abc}	11,600,000 ^{ab}	1,160,000 ^{bc}	20,200,000 ^{ab}	36,232 ^a	57,555 ^{ab}	5,728 ^c
E	50	0	100	5	6,090,000 ^c	9,180,000 ^b	920,000 ^c	16,200,000 ^b	37,370 ^a	56,830 ^b	5,800 ^c
F	50	0	50	6	6,910,000 ^{abc}	11,000,000 ^{ab}	1,000,000 ^c	19,000,000 ^{ab}	36,232 ^a	58,342 ^{ab}	5,425 ^c
G	100	100	0	7	6,710,000 ^{bc}	12,100,000 ^{ab}	950,000 ^c	19,800,000 ^{ab}	34,549 ^a	60,441 ^a	5,008 ^c
H	100	0	100	8	8,760,000 ^a	13,400,000 ^a	1,110,000 ^c	23,300,000 ^a	37,081 ^a	58,019 ^{ab}	4,897 ^c
I	100	0	50	9	6,770,000 ^{abc}	11,100,000 ^{ab}	1,010,000 ^c	18,900,000 ^{ab}	35,725 ^a	58,924 ^{ab}	5,351 ^c

Letras iguales en la misma columna nos indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

TABLA 7. ANÁLISIS DE TIPOS DE HEMOCITOS Y PORCENTAJES (HH, HS, HG, HT)

En el gráfico 1 Aunque no se observó diferencias significativas estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, se analiza la cantidad de HH en el T-8 que contiene como dieta (100% de harina de pescado y mineral orgánico) y el T- 1 que presentan (0% de HP y 100% MO) respectivamente nos reflejan los mejores resultados; mientras que el T-5 compuesto por (50% HP y 100% MO) indican niveles bajos HH.

En lo que respecta a HS el T-8 y T-3 (0% HP y 50% MO) presentan los mayores niveles de estas células con funciones inmunológicas mientras que los niveles más bajo de HS T-5 compuesto por (50% HP y 100 MO).

Posteriormente al comparar el HG en el T-1 (0% HP y 100% MI) y T-2 (0% y 100% MO) nos dieron los mejores respuestas, pero el T-E (50%HP y 100% MO) fue el de menor concentración.

“En resultados obtenidos en seis días de tratamientos se mostraron valores con $41,07 \times 10^5$ hemocitos/ml; una coagulación de 34,40 s y $4,44 \times 10^3$ UFC/ ml. Pero para catorce días posteriores en un segundo periodo evaluando el hemolinfa de *L. vannamei* obtuvo los mejores valores ($55,76 \times 10^5$ hemocitos/ml; una coagulación de 34,20 s y $15,4 \times 10^3$ UFC/ml)”. Navarro et al (2013).

“Los niveles de Hemocitos totales del *L. vannamei* son de relevante importancia para observar el efecto defensivo”. (Sung et al. 1994) “en el cual determinaron efectos positivos en durante procesos experimentales con bacterias en con concentraciones de 0,5 y 1.0 mg/ml de glucanos, pero no fue efectivo a 0,25 y 2.0 mg/ml de glucanos”.

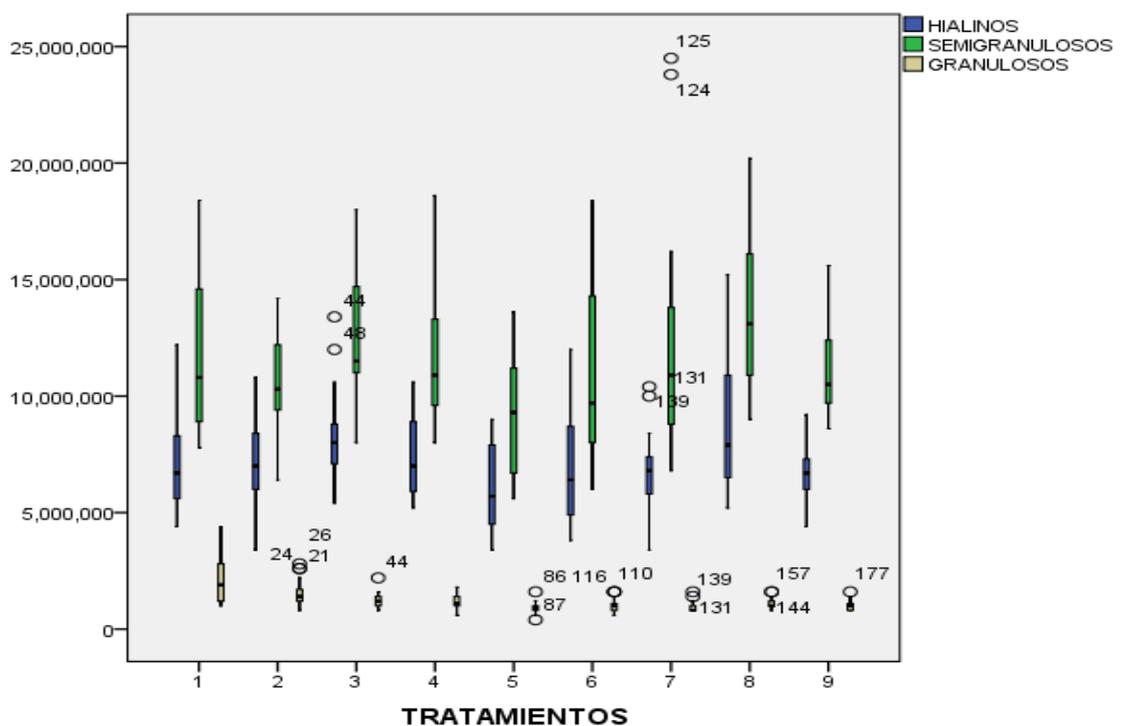


Gráfico 1. Conteos totales por tipos de Hemocitos presentes en la hemolinfa de los adultos de *L. vannamei* durante el trabajo experimental. Donde T-1 (0% HP + 100% MI), T-2 (0% HP + 100% MO), T-3 (0% HP+ 50% MO), T-4 (50% HP+ 100% MI), T-5 (50% HP+ 100% MO), T-6 (50% HP+ 50% MO), T-7 (100% HP+ 100% MI), T-8 (100% HP+ 100% MO), T-9(100% HP+ 50% MO).

9.2 PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

Dentro del análisis de los 9 tratamientos de Anión Superóxido con las tres dietas harina de pescado, minerales orgánicos e inorgánicos donde las mayores concentraciones de Actividad Base en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (52,500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en el T-A, para Actividad Estimulante (58,667 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) T-A y para O_2 Base (1,1917 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en T-E En Fenoloxidasa determinó buenos resultados en PO Sin La (88,333 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en T-I y PO Con La (93,000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en T-I; mientras que en Proteínas Plasmáticas el mejor valor se indicó en el T-H con (114,620 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Ver Tabla 8.

(O₂⁻)

(PO)

(PM)

Trat	HP %	MI %	MO %	N°	(O ₂ ⁻)			Fenoloxidasa		Proteína
					O ₂ ⁻ Ac. Ba.	O ₂ ⁻ Ac. St.	O ₂ ⁻ Tasa	Sin La	Con La	Plasmática
A	0	100	0	1	52,500 ^a	58,667 [°]	1,0800 [°]	41,667 ^b	45,000 ^b	85,762 ^b
B	0	0	100	2	46,000 ^{ab}	44,667 [°]	0,9717 [°]	47,000 ^b	50,667 ^b	100,640 ^{ab}
C	0	0	50	3	42,333 ^b	44,333 [°]	1,0550 [°]	46,667 ^b	50,000 ^b	92,290 ^{ab}
D	50	100	0	4	44,333 ^{ab}	44,333 [°]	1,0033 [°]	62,333 ^{ab}	66,333 ^{ab}	88,650 ^{ab}
E	50	0	100	5	41,833 ^b	49,833 [°]	1,1917 [°]	47,667 ^b	49,667 ^b	95,168 ^{ab}
F	50	0	50	6	42,333 ^b	44,000 ^a	1,0417 [°]	55,000 ^b	58,333 ^{ab}	98,688 ^{ab}
G	100	100	0	7	43,667 ^b	46,667 [°]	1,0683 [°]	49,000 ^b	51,333 ^b	89,710 ^{ab}
H	100	0	100	8	43,167 ^b	44,333 [°]	1,0250 [°]	53,000 ^b	57,000 ^{ab}	114,620 ^a
I	100	0	50	9	43,833 ^b	47,000 ^a	1,0717 [°]	88,333 ^a	93,000 ^a	100,220 ^{ab}

Letras iguales en la misma columna nos indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$)

Tabla 8. Conteos totales en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Anión Superóxido, Fenoloxidasa y Proteínas Plasmáticas en la hemolinfa de los adultos de *L. vannamei* durante el trabajo experimental.

9.3 ANIÓN SUPERÓXIDO

“En la actividad fagocíticas y antimicrobiana de los hemocitos se produce el anión superóxido” (Song & Hsieh, 1994; Muñoz *et al.*, 2000).

“Cuando se adicionan dosis de 2 mg mL^{-1} de laminarina (β -glucano) se produce un incremento del anión superóxido de las células hemocíticas del anión superóxido en los hemocitos de las especies” (*L. vannamei*, *schmitti* y *F. paulensis*), Guertler *et al.* (2010).

En el gráfico 2 la Actividad base si observamos significancia estadística ($p < 0.05$) entre los tratamientos, se analiza la cantidad en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de O_2^- Act. Ba en el T-1 que contiene como dieta (0% HP + 100% MI) obtuvo los mejores resultados; mientras que los niveles más bajo fue en el T-5 compuesta por (50% HP + 100% MO).

Por otro lado O_2^- Act. St. no se observaron significancias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos pero se encontró en punto más alto en el T-1 que contiene (0% HP + 100% MI) y un punto más bajo en el T-6 compuesta por (50% HP + 50% MO).

En lo respecta a O_2^- Tasa encontramos niveles más alto en el T-5 que contiene como dietas (50% HP + 100% MO) y un punto más bajo en el T-2 compuesta por (0% HP + 100% MO).

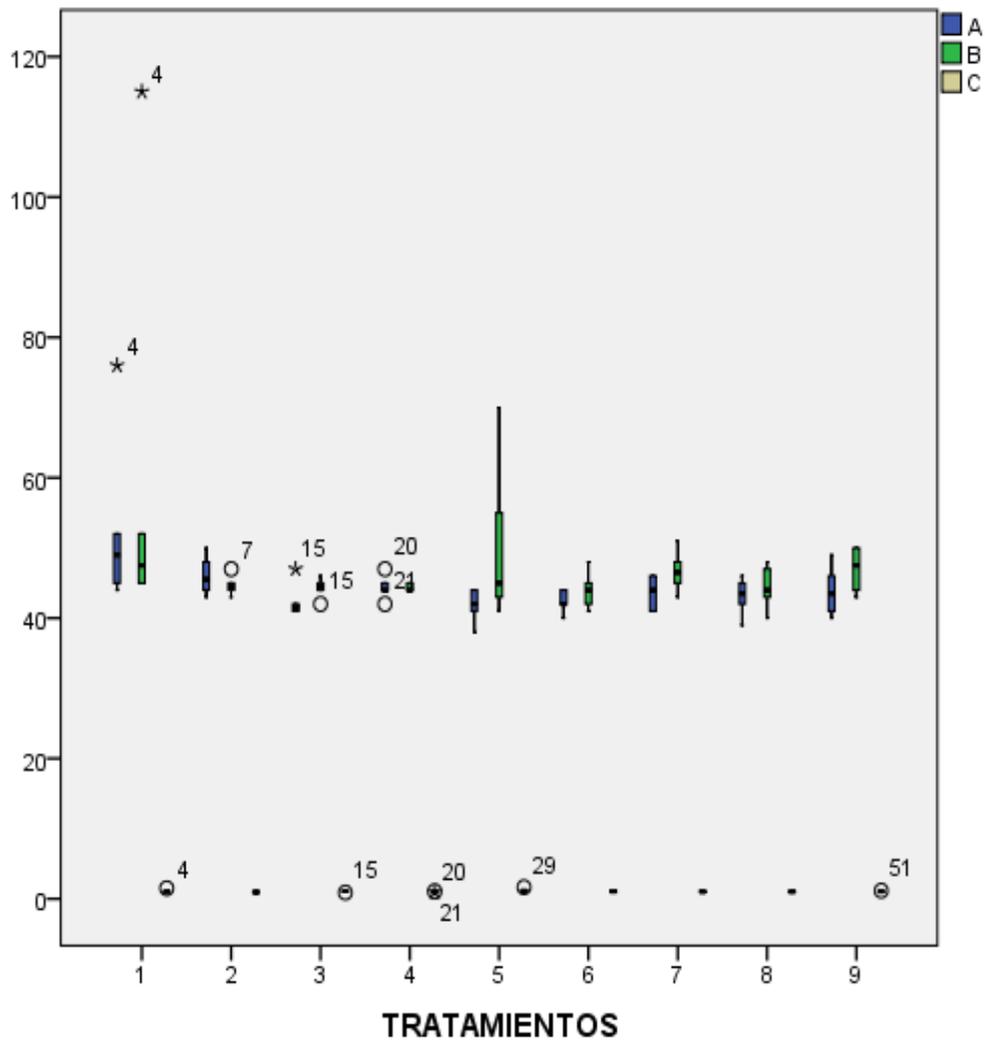


Gráfico 2. Conteos totales en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Anión Superoxido Base, Estimulante y Tasa presentes en la hemolinfa de los adultos de *L. vannamei* durante el trabajo experimental.

9.4 FENOLOXIDASA

“Los hemocitos del hemolinfa de *L. vannamei* potenciados con Laminarina (β 1,3-glucano), generaran un incremento en la producción anión superóxido” (Córdoba 2002).

En el grafico 3. La Fenoloxidasa aunque no observamos significancia estadística ($p < 0.05$) entre los tratamientos, se analiza la cantidad en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PO Sin La reportaron resultados favorables en el tratamiento 9 que contiene (100% HP + 50% MO); mientras que los niveles más bajo fue en el T-1 compuesta por (0% HP + 100% MI).

Por otro lado los resultados de Fenoloxidasa Con La reportaron resultados favorables en el tratamiento 9 que contiene (100% HP + 50% MO); mientras que el punto más bajo nos dio en el T-1 compuesta por (0% HP + 100% MI).

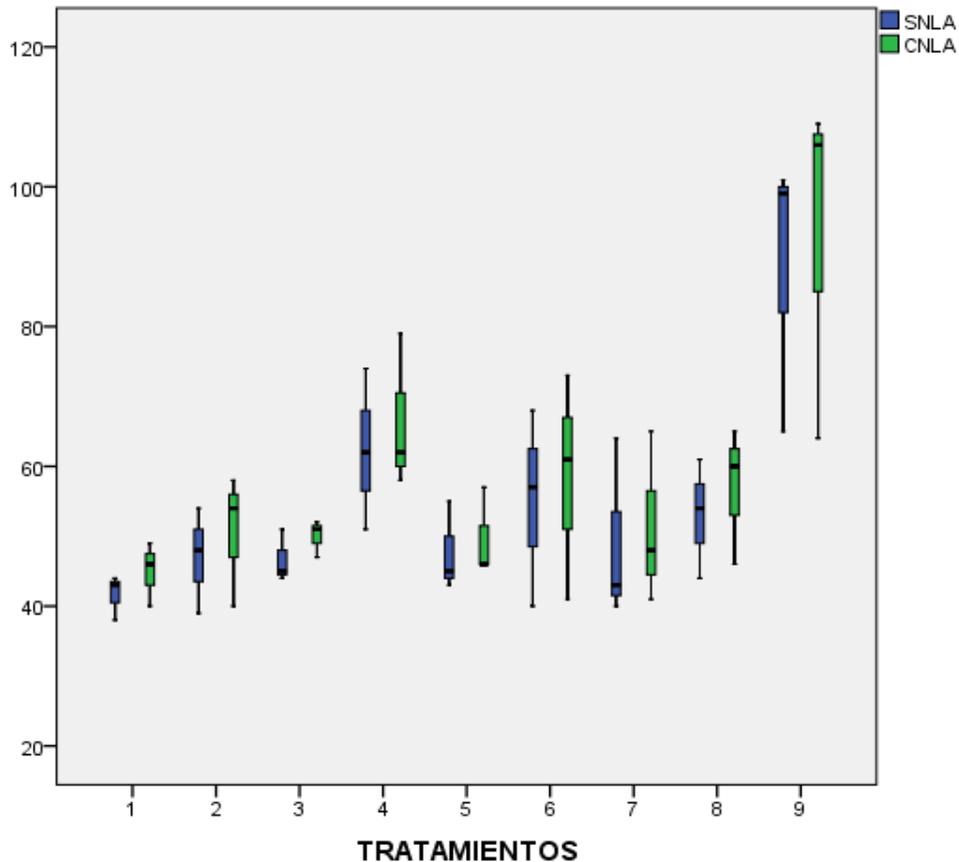


Gráfico 3. Conteos totales en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Fenoloxidasa Sin Laminarina y Con Laminarina en la hemolinfa de los adultos de *L. vannamei* durante el trabajo experimental.

9.5 PROTEINAS PLASMÁTICA

En el gráfico 4 Aunque en Proteínas Plasmáticas si observamos significancia estadística ($p < 0.05$) entre los tratamientos, se analiza la cantidad en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PM en el T-8 que contiene como dieta (100% HP + 100% MO) se obtuvo los mejores

resultados; mientras que los niveles más bajo fue en el T-1 compuesta por (0% HP + 100% MI). “Resultados semejantes han sido detallados en las proteínas plasmáticas en juveniles de *P. Japonicus*” (Rodríguez, 1993).

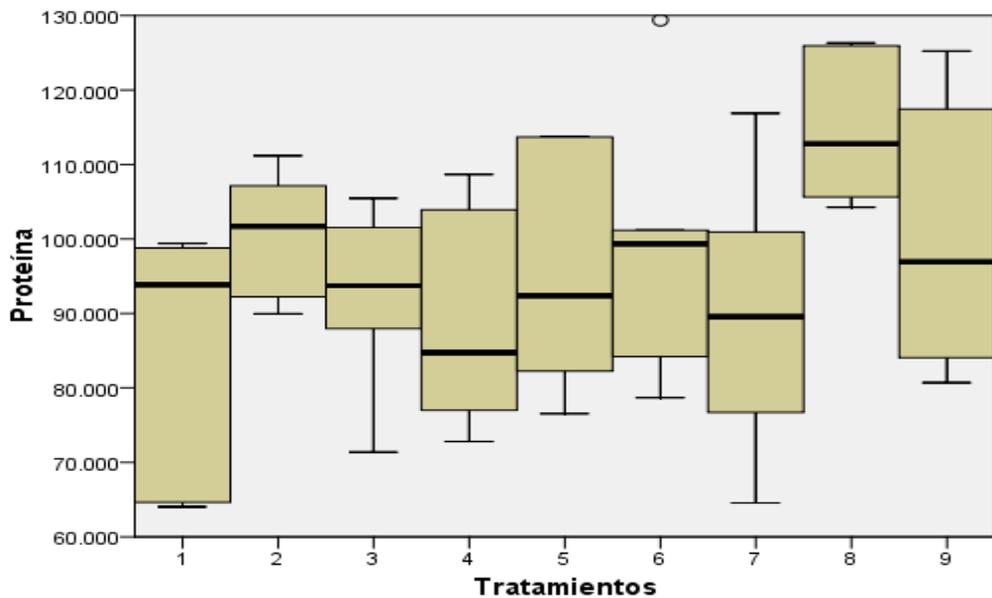


Gráfico 4. Conteos totales en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Proteínas Plasmáticas en la hemolinfa de los adultos de *L. vannamei* durante el trabajo experimental.

9.6 ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE MINERALES

Se analizaron en los 9 tratamientos con tres dietas harina de pescado, minerales orgánicos e inorgánicos donde las mayores concentraciones de minerales en

mg/kg con el Zn (2,5325 mg/kg) en el T-E mientras que en ele T-H se obtuvo (2,6225 mg/kg) de Cu, en el T-A se obtuvo (0,9650 mg/kg) de Mn y para él Se en el T-C nos dio (0,0325 mg/kg), ver Tabla 9.

Trat	HP %	MI %	MO %	N°	mg/Kg			
					Zn	Cu	Mn	Se
A	0	100	0	1	0,5875 ^b	1,1850 ^a	0,9650 ^a	0,0175 ^b
B	0	0	100	2	1,0550 ^b	1,6400 ^a	0,8200 ^a	0,0250 ^{ab}
C	0	0	50	3	1,2950 ^{ab}	1,1000 ^a	0,6225 ^a	0,0325 ^a
D	50	100	0	4	0,7100 ^b	1,2200 ^a	0,8075 ^a	0,0225 ^{ab}
E	50	0	100	5	2,5325 ^a	2,4900 ^a	0,6950 ^a	0,0250 ^{ab}
F	50	0	50	6	1,1125 ^{ab}	1,3825 ^a	0,8475 ^a	0,0200 ^{ab}
G	100	100	0	7	1,1275 ^{ab}	2,3375 ^a	0,8925 ^a	0,0175 ^b
H	100	0	100	8	0,4950 ^b	2,6225 ^a	0,5775 ^a	0,0150 ^b
I	100	0	50	9	0,4325 ^b	0,9225 ^a	0,5675 ^a	0,0225 ^{ab}

Letras iguales en la misma columna nos indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

TABLA 9. Conteos totales por mg/kg de minerales orgánicos e inorgánicos presentes en la hemolinfa de los adultos de *L. vannamei* durante el trabajo experimental.

9.7 MINERALES (Zn, Cu, Mn, Se)

“El zinc es requerido para normal crecimiento, desarrollo y función en todas las especies animales que han sido estudiados. Las funciones del zinc como factor en varios sistemas enzimáticos y es un componente de un gran número de metal o enzimas” (NRC, 1980).

En el gráfico 5 se analiza la cantidad en mg/kg de Zn en el T-5 que contiene como dieta (50% HP + 100% MO) obtuvo los mejores resultados; mientras que los niveles más bajo fue en el T-9 compuesta por (100% HP + 50% MO).

Por otro lado los resultados de Cobre no se observaron significancia estadísticas entre los tratamientos pero se encontró en punto más alto en el T-8 que contiene (100% HP + 100% MO) y un punto más bajo en el T-9 compuesta por (100% HP + 50% MO).

En lo respecta con el Manganese encontramos niveles más alto en el T-1 que contiene como dietas (0% HP + 100% MI) y un punto más bajo en el T-9 compuesta por (100% HP + 50% MO).

Para el Selenio encontramos que los niveles más altos fue en el T-3 compuesta por (0% HP + 50% MO); mientras que en el T-8 que contiene como dietas (100% HP + 100% MO) se encontró el punto más bajo entre los 9 tratamientos usados en el bioensayo.

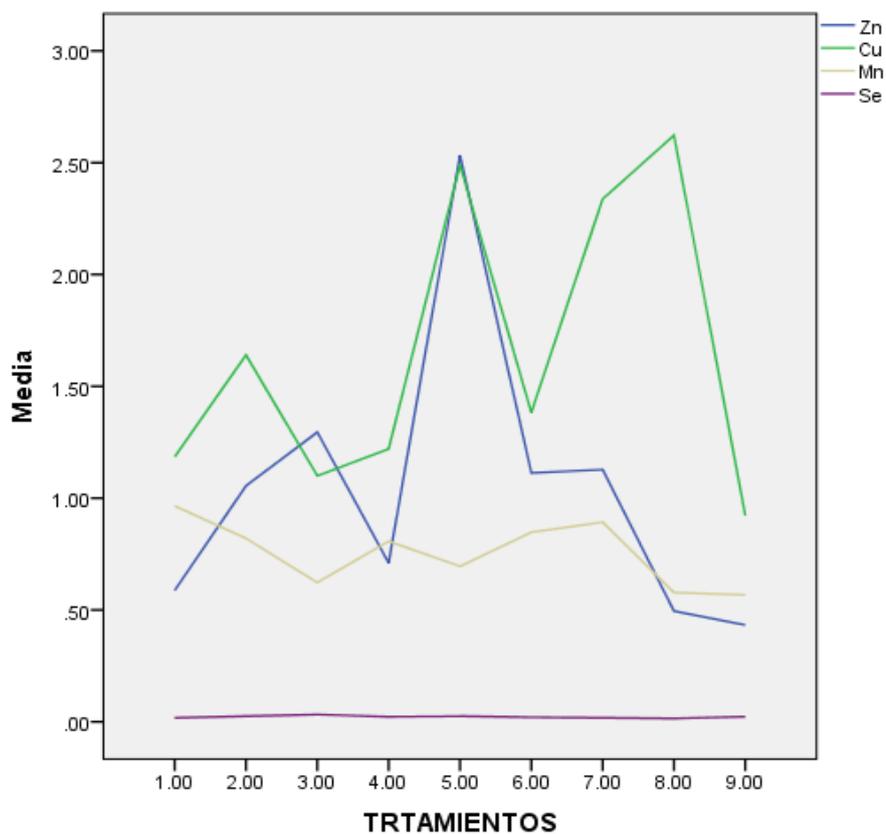


Gráfico 5. Conteos totales en mg/kg de Minerales como Zinc, Cobre, Manganeso y Selenio presentes en la hemolinfa de los adultos de *L. vannamei* durante el trabajo experimental.

9.8 RESULTADOS PRODUCTIVOS

Se analizaron en los 9 tratamientos con tres dietas harina de pescado, minerales orgánicos e inorgánicos donde las mayores concentraciones en gramos a nivel de producción en el T-B nos dieron (12,883 g) en la biomasa inicial mientras que en el T-D tuvo una biomasa final de (41,858 g) en el incremento de biomasa se obtuvo (29,133 g) en el T-D, en el peso promedio final son dio (4,649 g) en el T-E, en el consumo del alimento dio como resultado (184,52 g) en el T-G, para la conversión alimenticia en el T-C nos dio (10,025) pero en el FCR corregida se obtuvo (3, 6776 g) en el T-E y en el T-G tuvimos la mayor sobrevivencia de todos los tratamientos analizados, ver Tabla 10.

No hubo diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos ni hubo interacciones entre uso harina de pescado o mineral.

Se observaron tendencias positivas en el peso final promedio y FCR con el uso de 100% minerales orgánicos y 50% harina pescado (Tratamiento E).

Se observaron tendencias positivas en incremento de biomasa y la sobrevivencia con el uso de 100% Mineral orgánico.

Trat	HP	MI	MO	N°	Biomasa	Biomasa	Increment.	Peso	consumo	Convers.	FCR	
					Inicial	Final	Biomasa	Final promedio			alimento	Aliment.
A	0	100	0	1	12,655 ^a	36,007 ^a	23,352 ^a	4,236	164,38 ^a	6,510 ^a	4,1262 ^a	88,33 ^a
B	0	0	100	2	12,883 ^a	37,317 ^a	24,433 ^a	4,146	173,97 ^a	7,362 ^a	4,4236 ^a	90,00 ^a
C	0	0	50	3	12,493 ^a	34,195 ^a	21,702 ^a	3,871	174,55 ^a	10,025 ^a	4,9843 ^a	88,33 ^a
D	50	100	0	4	12,725 ^a	41,858 ^a	29,133 ^a	4,330	182,45 ^a	6,613 ^a	4,4602 ^a	96,67 ^a
E	50	0	100	5	12,640 ^a	40,292 ^a	27,652 ^a	4,649	165,13 ^a	5,442 ^a	3,6776 ^a	86,67 ^a
F	50	0	50	6	12,173 ^a	35,950 ^a	23,777 ^a	4,229	171,13 ^a	7,480 ^a	4,2465 ^a	85,00 ^a
G	100	100	0	7	12,723 ^a	41,195 ^a	28,472 ^a	4,120	184,52 ^a	6,887 ^a	4,6044 ^a	100,00 ^a
H	100	0	100	8	12,703 ^a	35,867 ^a	23,163 ^a	3,985	173,52 ^a	7,933 ^a	4,5705 ^a	90,00 ^a
I	100	0	50	9	12,812 ^a	38,358 ^a	25,547 ^a	4,110	177,08 ^a	7,568 ^a	4,4794 ^a	93,33 ^a
Trat HP												
%												
0	0				12,677 ^a	35,839 ^a	23,162 ^a	4,8639 ^a	172,91 ^a	7,9656 ^a	4,5114 ^a	87,778 ^a
1	50				12,513 ^a	39,367 ^a	26,854 ^a	4,4090 ^a	178,37 ^a	6,5118 ^a	4,1281 ^a	89,444 ^a
2	100				12,746 ^a	38,473 ^a	25,727 ^a	4,7722 ^a	172,91 ^a	7,4628 ^a	4,5514 ^a	94,444 ^a
Trat M												
%												
1	100 MI				12,701 ^a	39,687 ^a	26,986 ^a	4,4989 ^a	177,12 ^a	6,6700 ^a	4,3969 ^a	93,889 ^a
2	100 MO				12,742 ^a	37,825 ^a	25,083 ^a	4,5346 ^a	170,87 ^a	6,9123 ^a	4,2239 ^a	88,889 ^a
3	50 MO				12,493 ^a	36,168 ^a	23,675 ^a	5,0117 ^a	174,26 ^a	8,3578 ^a	4,5701 ^a	88,889 ^a

Letras iguales en la misma columna nos indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 10. Resultados productivos de ganancia de peso por tratamiento, FCR y supervivencia.

9.9 PORCENTAJES DE CRECIMIENTOS

Estudios realizados por (Molina 2004) “en el cual realizó un reemplazo parcial de HP por un 50% de harina de lupino en camarón Blanco *L. vannamei* sin afectar el crecimiento y la supervivencia >80%, tampoco disminuyó significativamente la proteína”.

“En la adición de dietas de proteínas vegetales al bajar del 40% al 20% se producen una afectación tanto en la supervivencia como el crecimiento, considerando que no se debe reducir el nivel de proteína en los primeros estadios de post-larvas” (Brito 2006).

“Postlarvas alimentadas con mezclas de fuentes de proteína vegetal l incremento de peso si son alimentadas de manera adecuada, manteniendo los indicadores metabólicos y el balance energético que alimentados con dietas de origen de animales marinos” (Gaxiola et al., 2006).

Según los resultados obtenidos del grafico 6 se inició con una biomasa inicial de 12 g de promedio, posteriormente los tratamientos con mejores valores (biomasa final) fueron T-7, T-4 y T-5 (41,19g, 41,89 g y 40,29 g) respectivamente los

cuales indican mejores tasas de incremento de biomasa en correlación al periodo del trabajo experimental.

En lo referente a la supervivencia de los diferentes tratamientos el T-7 que integra en su dieta (100%HP + 100% MI) se observó que existió mortalidad alguna, seguido de T-9 (100% HP + 50% MO) con 93,3% de supervivencia, pero no fue así para el T-6 (50% HP y MO) donde se redujo un 15% de la misma.

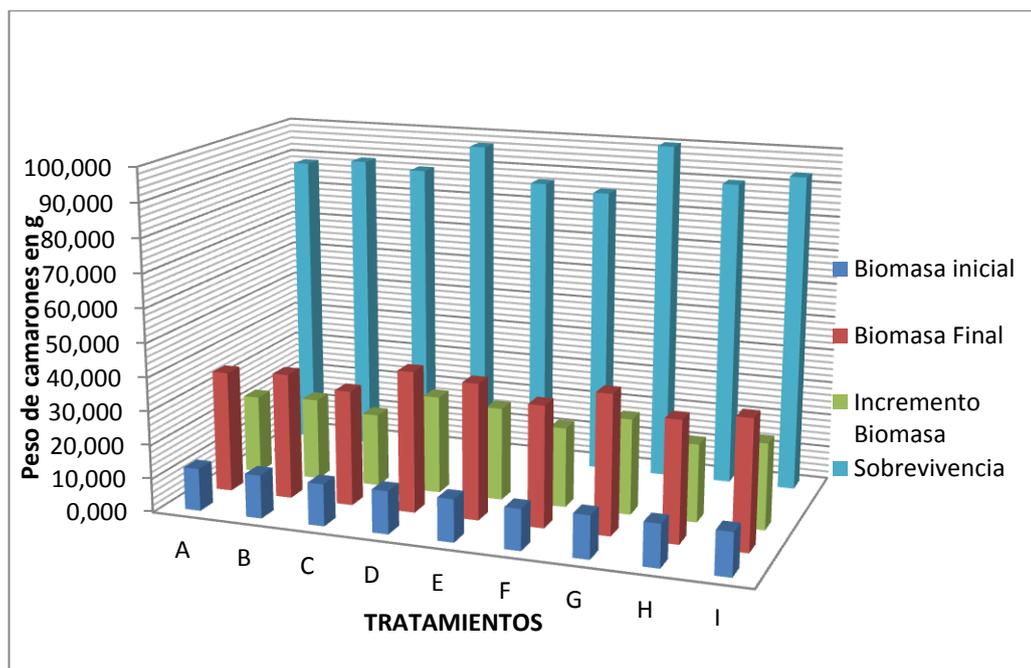


Gráfico 6. Biomasa inicial, biomasa final, incremento de biomasa y supervivencia de juveniles *L. vannamei* alimentado con dietas experimentales que contienen diferentes niveles de harina de pescado, mineral orgánico e inorgánico.

10. DISCUSIONES

Prieto *et al.* (2005) “efectuó una evaluaciones de seis y catorce días. Para la primera en el T1 el conteo total de hemocitos fue mayor en T1 al obtener $41,07 \pm 7,56 \times 10^5$ cel./ml; mientras el T2 ($35,29 \pm 9,25 \times 10^5$ cel./ml) obtuvo el conteo con menor células. A pesar de lo anterior, los datos obtenidos no indican una diferencia significativa, al determinar el efecto ocasionado por el tratamiento control (T0) se obtiene un nivel mayor de hemocitos presente en la hemolinfa cuyas dietas contenían aditivos adicionales, analizando el ejemplo del ajo y extractos de plantas, menciona la principal función del ajo por la acción microbiana porque durante los catorce días el conteo mayor obtenido en el hemograma mantenía en su dieta ajo fue la que contenía $55,76 \pm 2,41 \times 10^5$ cel./ml logró una diferencia marcada con respecto a T0 alrededor de un 26,5%”. En este trabajo los mejores resultados con el Tratamiento # 8 $23,3 \times 10^5$ cel/ml que contiene (100% Harina de pescado + 100% Mineral Inorgánico) en la lectura de hemocitos totales.

La potenciación de los hemocitos de *P. vannamei* con laminarina (β 1,3-glucano), generó un incremento en la generación de anión superóxido (Córdoba 2002); analizando los resultados observó que utilizando (100% de HP y 50% de MO) con la adición de laminarina se incrementó a un $9,3 \times 10^4$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Fenoloxidasa presente en el hemolinfa y $88,3 \times 10^4$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sin la complementación de Laminarina.

Evaluando la respuesta oxidativa generada en *P. vannamei*, se determinó la generación de anión superóxido en hemocitos activados con β -glucano (0.5 mg/l) y polisacárido sulfatado (1 μ g/l), cuyo propósito era la inmersión adecuada para la activación y respuesta de los hemocitos. Resultados descritos por Espinosa *et al* (2002), “encontrando valores con tendencia a cero. La generación de anión superóxido en hemocitos de camarón se incrementó entre 1.5 y 2.0 veces más que la respuesta generada por el grupo control de los organismos de análisis”. El diseño experimental fue *in vivo* se utilizaron HP, MI, MO, teniendo resultados favorables con MI en Act. Base, Act Est. y Tasa (52,500; 58,667 y 1, 08). Donde se analiza la cantidad en μ g/ μ l de O_2^- Act. Ba en el T-1 que contiene como dieta (0% HP + 100% MI) obtuvo los mejores resultados; mientras que los niveles más bajo fue en el T-5 compuesta por (50% HP + 100% MO). Por otro lado O_2^- Act. st no se observaron significancias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos pero se encontró en punto más alto en el T-1 que contiene (0% HP + 100% MI). Al incluir a O_2^- Tasa se encontró niveles más alto en el T-5 que contiene como dietas (50% HP + 100% MO).

Los mejores resultados en actividad de fenoloxidasa con y Sin Laminarina en el tratamiento que contenía una dieta de (100% HP + 50 MO); 93,000 y 88,333 μ g/ μ l respectivamente, pero se determinaron grandes variantes para la actividad de la fenoloxidasa de los animales en todas sus aplicaciones; “aunque para los animales alimentados con dos dosis *Phaffia*, se obtuvo resultados muy bajos la

más uniformes que los demás, con valores significativamente más bajos ($p=0.003$) que los del tratamiento control” según García (2000) .

Rodríguez et al (2003). “Menciona en un trabajo experiemental luego de termianr su primer bioensayo que los resultados de concentración a nivel proteínico se obtuvieron entre 60 y 100 ug.ul-1, ubicando los menores valores en el T3; mientras los tratamientos 1 y 2 no existieron diferencias significativas ($P> 0.05$), luego los valores para las proteínas plasmáticas se ubicaron entre 45 y 60 ug.ul-1, el mejor promedio para la adición de la dieta con 50 % de proteína”. Aunque en el experimento realizado se encontró valores significativos en el T.8 y T-2 con 100% MO (114,620 ug/ul y 100,640 ug/ul) y la más baja 85,762 ug/ul T-1, al final del procedimiento experiemental.

Siendo el Selenio es un elemento traza cuya función principal como un componente de la familias de las enzimas llamada Glutations Peroxidasa la cual convierte el peróxido de hidrogeno y lípidos hidroperóxidos hacia agua y lípidos alcoholes. Actúa junto con la vitamina E como antioxidante biológico para proteger fosfolípidos poliinsaturados en las membranas celulares y subcelulares.

Sritunyalucksana et al. (2011), examinaron el efecto de la suplementación de selenio (Se) en el crecimiento del camarón y la resistencia a la enfermedad

después del desafío al Virus del Síndrome de Taura (TSV). Grupos de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) de una cepa conocida por su sensibilidad a la TSV se alimentaron con 3 dietas : (1) de alimentación estándar comercial de camarón (0,58 ppm de contenido de Se) sin suplementación de Se (grupo de la dieta estándar), (2) de alimentación comercial estándar más 0,3 ppm Se inorgánica (Inorg Se-grupo), y (3) de alimentación comercial estándar más 0,3 ppm de Se orgánico (Org Se-grupo) durante un período de 5 semanas.

Después del ensayo de alimentación, la suplementación de Se orgánico al alimento de camarones mejoró el crecimiento, número de hemocitos, y la supervivencia después del desafío a TSV, mientras que el Se inorgánico no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento o el número de hemocitos y mostró un menor grado de mejoría en la supervivencia después de la exposición al TSV.

“Esto podría ser explicado por diferencias en la biodisponibilidad. La biodisponibilidad de Se obtenido a partir de una fuente orgánica fue mayor que la obtenida de una fuente inorgánica de salmón del Atlántico y bagre de canal” (Bell y Cowey, 1989; Wang y Lovel, 1997).

En el día 6 después de la exposición TSV, el número de supervivientes en el grupo Se orgánico (66,7%) también fue significativamente más altos que los del grupo de dieta estándar (13,3%) y Se Inorgánico (35,5%). Análisis de RT-PCR

anidada mostró que el número de camarones con infección grave en el grupo Se orgánico (2/5) era menor que el Se inorgánico (4/5) y grupo de dieta estándar (4/4).

“Un número de estudios han demostrado que la suplementación de Se orgánico de Se-levadura tiene mayor biodisponibilidad que la Se inorgánico” (Beilstein y Whanger, 1986; Fairweather-Tait, 1997). “El aumento en la absorción y el almacenamiento de Se orgánico es probablemente debido a su incorporación directa en proteínas” (Combs Jr, y Combs 1986). “Se ha informado anteriormente el efecto de Se orgánico en la mejora del crecimiento en el bagre de canal. Bagre alimentados con Se procedente de fuentes orgánicas tuvo un mejor crecimiento que los alimentados con Se de fuentes inorgánicas en niveles óptimos pero no a niveles por encima del requerimiento dieta mínima” Gatlin III, Wilson, 1984).

“Las dietas prácticas contienen ingredientes que son fuentes relativamente rico en Zinc (por ejemplo, harina de pescado). Sin embargo, para los peces la biodisponibilidad de Zinc en estos piensos es generalmente muy baja, lo que hace necesario la suplementación” (Watanabe et al 1988.).

“La biodisponibilidad del zinc en varias harinas de pescado se ha encontrado a estar inversamente relacionada con el contenido de fosfato tricálcico de la harina y

por lo tanto es generalmente más baja en la harina de pescado blanco y un poco mejor en las harinas de pescado de color marrón” (Watanabe et al. 1988). Las dietas prácticas también pueden contener ingredientes que contienen niveles relativamente altos de fitato que se ha demostrado a afectar a la biodisponibilidad de Zinc en una variedad de peces.

Davis y colaboradores (1993) “llevaron a cabo experimentos para determinar el requisito de zinc en la dieta de *Penaeus vannamei* y evaluar los efectos del fitato sobre la biodisponibilidad de zinc. Camarones juveniles (peso promedio 0.058 g) previamente alimentados con una dieta basal fueron con una de las siete dietas que contenían zinc (Zn) suplementario (0, 15, 30, 60 mg / kg de dieta) y sin fitato o suplementos de Zinc (0, 60, 200 mg / kg de dieta) con 1,5 % de fitato de 33 días .El aumento de peso fue mayor en camarones alimentados con 15mg Zn / kg dieta”.

En ausencia de fitato de la dieta, las concentraciones de zinc en el hepatopáncreas de camarones se maximiza cuando el zinc se complementó niveles mayores que o iguales a 15 mg Zn / kg de dieta (33 mg Zn total / kg). La suplementación de 1,5 % de fitato de la dieta no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento peor si deprimió los niveles de zinc en el hepatopáncreas. Suplementación de 200 mg de Zn / kg de dieta se requiere para superar la biodisponibilidad deprimida de Zinc causado por la presencia de fitato de la dieta y volver los niveles de zinc de los

hepatopáncreas a la observada cuando fitato no estaba presente. El ensayo de digestibilidad mostro que fósforo fitato no estaba disponible para el camarón y la presencia de fitato deprime la biodisponibilidad de fósforo y zinc.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- El incremento de hemocitos totales en la hemolinfa en adultos de *L. vannamei* se logró bajo condiciones de este estudio permitiendo demostrar resultados positivos adicionando en la dieta alimenticia una mezcla de 100% de Mineral orgánico y Harina de pescado.
- El efecto positivo en anión superóxido se evidenció en los análisis con uso de (50 y 100%) HP y MO respectivamente Tasa, se obtuvo en la Act. base y Estimulante mejores resultado con la inclusión de (0% HP + 100% MI) T-A.
- Según los resultados obtenidos el tratamiento (H) (100% mineral orgánico) obtuvo la mejor respuesta ($p < 0.05$) en valores de Proteína Plasmática, no obstante el (T-A) que contenía (100% mineral inorgánico) no presenta los nutrientes esenciales para que el organismo pueda producir mayores niveles proteínicos.

- Para la prueba de Fenoloxidasa sin-La, con adición de (50% de mineral orgánico), se comprobó una mejor respuesta en cuanto a la concentración de la Proteína plasmática.
- Las interacciones entre la Harina de pescado y Mineral inorgánico para el Zinc y Selenio, evidenció que niveles de (50% de mineral orgánico) generan mayores niveles de este mineral de relevante importancia en respuestas inmunológicas existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), equivalente como emplear en tratamientos el (0% harina de pescado). En cambio para el Zinc, el uso de la fuente mineral al 100% no dio diferencias.
- Con relación al Manganeso en los diferentes tratamientos no presentaron diferencias significativas para determinar si el incremento o disminución este oligoelemento podría generar al impacto a nivel inmunológico del animal.
- Tendencia positiva en Cu en el tejido en especial en el aumento el tratamiento con él con la adición (100% de HP y MO), disminución de FCR y la ganancia de peso en los camarones.

- Viabilidad uso minerales orgánicos bajo condiciones agua fría y etapas iniciales de cultivo.
- Es posible reducir 50 y 100% harina pescado empleando Minerales orgánicos y tener iguales rendimientos productivos y mejorar el costo dieta.
- Se recomienda seguir haciendo pruebas a nivel fisiológico, inmunológico, usando alimento balanceado con adición de minerales orgánicos e inorgánicos, en el camarón.
- Realizar un análisis sobre costos y beneficios de los usos de minerales orgánicos e inorgánicos versus la sustitución de harina de pescado, a nivel de producción en sistemas intensivos.
- Probar la adición de minerales orgánicos en dietas a base de harina de soya, quinua, sorgo o algún otro balanceado de origen vegetal.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aquaculture Congress & Exhibition, Oct. 25 – 28, 2000. Panamá, Panamá.
Asociación Panameña de Acuicultores and the Latin American Chapter of the
World Aquaculture Society

2. Aguirre-Guzmán G, Sánchez-Martínez J.G, Campa-Córdova A.I, Luna-González A, Ascencio F. (2009) Penaeid shrimp immune system: A Minireview.
Thai Journal of Veterinary and Medicine 39, 205-215.

3. Agustin, B., 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. Vet. Microbiol. 140,
310-317

4. AKIYAMA, D., W. DOMINY, AND A. LAWRENCE, 1991 Penaeid shrimp
nutrition for the commercial feed industry: Revised proceeding of the aquaculture
feed processing and nutrition workshop, pp. 19-25

5. ARELLANO E.1990. Guías técnicas en el cultivo de larvas de camarón
.Espol-Guayaquil-Ecuador.

6. Berger, C. (2000) Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. Asociación Langostina Peruana (ALPE). 102-110

7. Bell JG, Cowey CB (1989) Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo solar*). *Aquaculture* 81, 61–8.

8. Beilstein MA, Whanger PD (1986) Deposition of dietary organic and inorganic selenium in rat erythrocyte proteins. *J Nutr* 116, 1701–10.

9. Branford, J.R. 1981. Sediment and the distribution of penaeid shrimp in the Sudanese Red Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 13(3):349-354

10. Campa-Córdova, A. I., N. Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis and F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 12:353-366.

11. Combs GF Jr, Combs SB (1986) *The Role of Selenium in Nutrition*, Academic Press, and Orlando.

12. Chang, E. 1991. Crustacean molting hormones: cellular effects, role in reproduction and regulation by molt-inhibiting hormone. In: *Developments in Aquaculture and Fish Science*, P. F. Deloach, W. J. Dougherty and M. A. Davidson. Elsevier, 22, 83-101.

13. Destoumieux, D. Cols. (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid Shrimp (Crustacea, Decapoda). *CMLS, Cellular and Molecular Life Science*, 57,1260-1260.

14. Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez. J., Bilet, P., Comps, M. y Bachere, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*. 113: 461-469.

15. Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodríguez, and E. Bachere. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from

the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry* 272(45), 28398-28406.

16. Echeverría, L. F. 1997. Desarrollo de un ensayo de cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO) como una herramienta de inmuno evaluación del camarón *Penaeus vannamei*. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM. 1-17.

17.- Espinosa, G., T. Rodríguez, J. Marrero, L. Ramos, Y. Borrell, U. Bécquer, F. Nodas y N. Hernández (2002) Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 765-777

18. Fairweather-Tait SJ (1997) Bioavailability of selenium. *Eur J Clin Nutr* 51, S20–3.

19. Gargioni, R.; Barracco, M.A. 1998. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *Journal of Morphology*, 236: 209-221.

20. Gatlin DM III, Wilson RP (1984) Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. *J Nutr* 114, 627–33.
21. Gillett, R. 2008. Global study of shrimp fisheries. FAO Fisheries Technical Paper No. 415331p.
22. Holmblad, T. and Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in crustaceans, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172:111-123.
23. Hose, J.E., Martin, G.G. and Gerard, A.S. (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.*, 178: 33–45.
24. Jiravanichpaisal, P., B. L. Lee and K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immuno-biology*, 211:213-236.
25. Johansson, M- W.; Keyser, P.; Sritunyalucksana, K.; Soderhall, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191: 45-52.

26. Johansson, M. W. and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, 5:171-176.
27. Fonseca M., E. E. 2010. Comportamiento de la Erosion Bacteriana del Caparazon en *Penaeus vannamei* en el periodo 2005-2008. Tesis en opcion al Titulo Academico de Master en Ciencias en Medicina Preventiva Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Granma. Cuba.
28. Kurtz, J. 2005. Specific memory within innate immune systems *Trends Immunol*, vol. 26, n°4, pp: 186-192.
29. L. A.ROY, D. A. DAVIS, I. P. SAOUD & R. P. HENRY, 2007. Suplementación de potasio, magnesio y sodio cloruro en dietas prácticas para el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, criado en aguas baja salinidad
30. Le Moullac, G., D. Le Groumellec., S. Ansquer., S. Froissard., Levy Peva y Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp

Penaeus stylirostris in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 7: 227-232.

31. Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. and Aquacop. (1997). Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology* 7, 227-234.

32. Lozano. C. G; Luis M. S.; Augusto P. 2012. La inmunidad de los camarones, avances recientes. Disponible en Interne

33. Martínez, F. S. 2007. Sistema inmune en camarones. Asistencia Técnica Nicovita- ALICORP SAA. Boletín NICOVITA. Julio- septiembre. Edición Tumpis.

34. Macabee, B.J., Bruce, J.W., Weirich, C.R., Stokes, A.D. & Browdy, C.L. 2003. Use of super-intensive greenhouse-enclosed raceway systems for the production of juvenile *Litopenaeus vannamei*. p. 169 In: Abstracts of Aquaculture America 2003. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

35. Molina, C. 2001. Importancia del ciclo de muda y del horario de alimentación en el cultivo del *Litopenaeus vannamei*. Panorama Acuícola, 6: 66-67.

36.-MOLINA P., C.; MARTÍNEZ C., L.R.; QUADROS S., W. Alimentación suplementaria y manejo de la alimentación natural. En: **Estado Actual y Perspectivas de la Nutrición de los Camarones Peneidos Cultivados en Iberoamérica**. Rosas, C.; Carrillo, O.; Wilson, R.; Andreatta, E.R. (Eds). Programa CYTED-Universidad Autónoma de México. México, D.F. Pp. 231-275. 2006.

37. Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W. P. W. van der Knaap, E. Mialhe and E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 191:89-107.

38. Muñoz, M; & Montesdeoca. (2002). Expression on distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by hemocyte reactions in microbial Challenged Shrimp. Eur.J.Biochem, 269, 2678-2689.

39. Muñoz, M. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture* 191, pp 89-107.

40. Muñoz, M., 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para la evaluación del estado inmunitario del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de grado para la obtención del título de Acuicultor. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador

41. Muñoz M., Cedeño R., Rodríguez J., Knaap W.P.W., Mialhe E. & Bachere E. (2000) Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89-107

42. Muñoz, M., 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para la evaluación del estado inmunitario del camarón *Penaeusm vannamei*. Tesis de grado para la obtención del título de Acuicultor. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador

43. Muñoz, M. R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. van der Knaap, E. Mialhe, and E. Bachère. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89-107.

44. Muñoz, O. (2004). Comparacion entre extruido y pelletizado en alimento de camarones. En Cruz-Suarez, L. E., Ricque-Marie, D., Nieto-Lopez, M. G., Villarreal, D., Scholz, U. y Gonzalez, M. (Eds.). *Avances en Nutricion Acuicola. VII. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutricion Acuicola (Resumenes)*. Hermosillo, Sonora, México, pp. 397-417

45. Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W. P., Mialhe, E. and Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89-107.

46. National Research Council. 2001. The nutrient requirement of dairy cattle. Seventh edition. National Academy Press, Washington, D. C. 381 p.

47. Nelson Peña-Navarro, Ruth Vargas-Cordero, Alexander Varela- Mejías, 2013 *Productos naturales como estimuladores des sistema inmunológico de*

Litopenaeus vannamei, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*.24(1): 133-147

ISSN: 1021-7444

48. Patrick S y M.J. Larkin (1995) Non-Clonal Recognition and Immunomodulation. In: Immunological and Molecular Aspects Bacterial Virulence. 7-25

49. Prieto, A; Auro, A; Fernández, A; Pérez, MB. 2005. El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Tip Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 8(1):38-49.

50. Pascual Cristina; Ariadna Sánchez y Rosas, C. 2007. Bases teórico-prácticas para el conteo de células sanguíneas de camarones cultivados. Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

51. Polo, A. & R. Chamorro. 2000. Posible papel de toxinas en el Síndrome de Zoea II en camarones blancos *Litopenaeus vannamei*. 40 – 42. In 4th Latin American

52. Raa, J. 1996. The use of Immuno stimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3):229-288.

53. Rendon, L.; Balcazar, J. L. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, no 19, pp. 27-33. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales. Guayaquil. Ecuador.

Disponible en internet

http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/19_4.pdf

54 Reyes-Becerril M., Tovar-Ramirez D., Ascencio-Valle F., Civera- Cerecedo R., Gracia-Lopez V. & Barbosa-Solomieu V. (2008) Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture* 280, 39-44.

55. Rodríguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday, and J. Calderón. (2003)b. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases* 26, 439-450.

56. Rodríguez, J. and Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191:109-119.

57. Rodríguez A.; López. I Sujka. E; De la Cuesta. S; López .C 2013.

58. Rönnbäck, P., A. Macia, G. Almqvist, L. Schultz y M. Troell. 2002. Do Penaeid Shrimps have a Preference for Mangrove Habitats? Distribution Pattern Analysis on Inhaca Island, Mozambique. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55(3):427-436.

59. Robles R., Sorgeloos P., Van Duffel H. & Nelis H. (1998) Progress in biomedication using live foods. *Journal of Applied Ichthyology* 14, 207-212.

60. Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125-145.

61. Rodríguez, J. and Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191:109-119.

62. Ronan Power, 2004. Why organic trace minerals have enhanced bioavailability. *Feeding Times* /Vol. 9 No.1/
63. Saoud IP, DA Davis & DB Rouse. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture* 217: 373-383.
64. Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 3-23.
65. Smith, V.J. y K. Söderhäll (1983) Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell and tissue research*, 233:295-303
66. Valdez, G., Díaz, F., Re, A.D. y E. Sierra. 2008. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica*.18 (2): 105-115

67. Van de Braak, (2002). Preliminary Study on haemocyte response to White spot Syndrome Virus infection in black tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 51, 149-15.

68. Van De Braak, C.B.T.; Botterblom M.H.A.; Liu W.; Van Der Knaap, W.P.W.; Rombout, J.H.W.M. 2002a. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 253-272.

69. Vargas, F., *et al.* 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. Proc. Special Session on Shrimp Biotechnology, 5th. Asian Fisheries Forum, Thailand.

70. Vargas, F., I. Higuera, F. Jiménez, J. Hernández, T. Gollas y G. Yepiz (1996) Posibilidades de inmunestimulación del camarón a través del alimento. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 433-439.

71. Vargas, F. y G. Yepiz (1998) Shrimp Immunity. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol*, 5: 195-210

72. Vázquez, L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala y E. Zenteno (1998) Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia*, 23(6): 344-348

73. Vici V., Bright Sing I.S., Bhat S.G. Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis. *Fish Shellfish Immunol* 2000; 10:559-563.

74. Víctor Manuel Alfaro López. Reyes Jesús Alarcón Lucero del 2LM, Moléculas orgánicas y Moléculas inorgánicas. Tijuana B.C 19 de mayo del 2011.

75. Zhen-Ming C., Liu G., Zhao S., Li J. & Peng Y. (2010) Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1227–1241.

76. EPA 7000 B “Flame Atomic Absorption Spectrophotometry”. 2007 Norma Argentina IRAM 301 - Norma ISO/IEC 17025. Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración.

77. Shiau Shi Yen and Hsieh Jia Fen 2001, clasificación general de los elementos minerales esenciales.

78. Wang C, Lovell RT (1997) Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 152, 223–34.

ANEXO I

Tabla11. HEMOGRAMA DE HEMOCITOS TOTALES

Tratamiento	Hemocitos			
	Hialinos	Semigranulosos	Granulosos	Totales
1	5,000,000	12,000,000	2,800,000	19,800,000
1	7,000,000	8,600,000	1,200,000	16,800,000
1	5,800,000	10,800,000	1,000,000	17,600,000
1	5,600,000	10,000,000	2,000,000	17,600,000
1	8,800,000	15,600,000	3,000,000	27,400,000
1	5,000,000	12,000,000	2,800,000	19,800,000
1	7,000,000	8,600,000	1,200,000	16,800,000
1	5,800,000	10,800,000	1,000,000	17,600,000
1	5,600,000	10,000,000	2,000,000	17,600,000
1	8,800,000	15,600,000	3,000,000	27,400,000
1	10,600,000	18,400,000	4,400,000	33,400,000
1	6,800,000	13,200,000	1,800,000	21,800,000
1	7,800,000	13,600,000	2,400,000	23,800,000
1	12,200,000	17,600,000	3,800,000	33,600,000
1	10,000,000	16,400,000	2,800,000	29,200,000
1	6,600,000	8,400,000	1,600,000	16,600,000
1	7,000,000	9,600,000	1,600,000	18,200,000
1	5,600,000	9,200,000	1,400,000	16,200,000
1	4,400,000	8,600,000	1,000,000	14,000,000
1	5,400,000	7,800,000	1,000,000	14,200,000
2	7,200,000	13,600,000	2,600,000	23,400,000
2	3,400,000	9,400,000	1,600,000	14,400,000
2	4,800,000	9,200,000	1,000,000	15,000,000
2	10,400,000	14,000,000	2,600,000	27,000,000
2	6,600,000	9,800,000	1,000,000	17,400,000
2	10,000,000	13,400,000	2,800,000	26,200,000

2	8,400,000	12,400,000	1,400,000	22,200,000
2	7,200,000	10,200,000	1,200,000	18,600,000
2	8,400,000	12,000,000	1,400,000	21,800,000
2	6,600,000	10,000,000	1,800,000	18,400,000
2	6,000,000	9,800,000	1,400,000	17,200,000
2	3,600,000	6,400,000	800,000	10,800,000
2	6,600,000	10,400,000	2,200,000	19,200,000
2	5,600,000	9,400,000	1,400,000	16,400,000
2	6,000,000	8,800,000	1,400,000	16,200,000
2	6,800,000	9,400,000	1,400,000	17,600,000
2	8,000,000	11,400,000	1,600,000	21,000,000
2	7,800,000	10,600,000	1,200,000	19,600,000
2	10,800,000	14,200,000	1,200,000	26,200,000
2	9,200,000	11,800,000	1,600,000	22,600,000
3	7,800,000	11,400,000	1,000,000	20,200,000
3	5,400,000	10,600,000	1,400,000	17,400,000
3	8,000,000	11,000,000	1,600,000	20,600,000
3	13,400,000	18,000,000	2,200,000	33,600,000
3	7,600,000	11,600,000	1,000,000	20,200,000
3	5,400,000	8,000,000	1,000,000	14,400,000
3	10,600,000	14,000,000	1,400,000	26,000,000
3	12,000,000	15,200,000	1,400,000	28,600,000
3	8,400,000	11,400,000	1,200,000	21,000,000
3	9,200,000	11,800,000	1,200,000	22,200,000
3	7,400,000	13,400,000	1,200,000	22,000,000
3	8,200,000	16,000,000	1,200,000	25,400,000
3	6,000,000	15,800,000	1,400,000	23,200,000
3	9,400,000	14,800,000	1,400,000	25,600,000
3	6,800,000	14,600,000	1,400,000	22,800,000
3	8,400,000	11,000,000	1,600,000	21,000,000
3	7,400,000	10,400,000	1,000,000	18,800,000
3	6,800,000	9,200,000	1,000,000	17,000,000

3	8,200,000	11,200,000	800,000	20,200,000
3	8,000,000	11,200,000	1,200,000	20,400,000
4	5,400,000	8,000,000	600,000	14,000,000
4	10,600,000	14,800,000	1,800,000	27,200,000
4	6,400,000	9,200,000	600,000	16,200,000
4	9,000,000	11,000,000	1,200,000	21,200,000
4	8,800,000	11,800,000	1,800,000	22,400,000
4	8,200,000	12,200,000	1,400,000	21,800,000
4	6,200,000	10,000,000	1,000,000	17,200,000
4	5,800,000	8,200,000	600,000	14,600,000
4	7,000,000	11,000,000	1,000,000	19,000,000
4	7,000,000	10,600,000	1,400,000	19,000,000
4	6,600,000	10,200,000	1,000,000	17,800,000
4	5,800,000	8,600,000	800,000	15,200,000
4	7,200,000	11,400,000	1,600,000	20,200,000
4	6,000,000	10,200,000	1,000,000	17,200,000
4	5,200,000	8,000,000	1,000,000	14,200,000
4	9,800,000	18,600,000	1,200,000	29,600,000
4	5,400,000	10,800,000	1,000,000	17,200,000
4	9,000,000	14,400,000	1,200,000	24,600,000
4	8,400,000	18,600,000	1,600,000	28,600,000
4	9,400,000	15,600,000	1,400,000	26,400,000
5	4,800,000	7,600,000	1,000,000	13,400,000
5	9,000,000	12,200,000	1,200,000	22,400,000
5	5,800,000	9,200,000	800,000	15,800,000
5	4,000,000	5,800,000	800,000	10,600,000
5	4,200,000	7,000,000	1,000,000	12,200,000
5	8,800,000	11,200,000	1,600,000	21,600,000
5	3,600,000	5,600,000	400,000	9,600,000
5	5,200,000	8,200,000	800,000	14,200,000
5	6,400,000	9,400,000	1,200,000	17,000,000
5	4,800,000	6,200,000	800,000	11,800,000

5	5,600,000	9,400,000	1,000,000	16,000,000
5	8,200,000	13,600,000	1,200,000	23,000,000
5	7,000,000	11,200,000	1,000,000	19,200,000
5	7,000,000	10,000,000	800,000	17,800,000
5	8,600,000	13,200,000	1,000,000	22,800,000
5	4,000,000	6,400,000	600,000	11,000,000
5	7,600,000	11,000,000	1,000,000	19,600,000
5	3,400,000	6,400,000	600,000	10,400,000
5	5,200,000	8,000,000	800,000	14,000,000
5	8,600,000	12,000,000	800,000	21,400,000
6	3,800,000	7,400,000	800,000	12,000,000
6	4,000,000	6,200,000	600,000	10,800,000
6	7,000,000	10,200,000	1,000,000	18,200,000
6	5,600,000	9,200,000	800,000	15,600,000
6	5,800,000	8,200,000	600,000	14,600,000
6	3,800,000	6,000,000	600,000	10,400,000
6	12,000,000	14,400,000	1,000,000	27,400,000
6	5,000,000	7,400,000	800,000	13,200,000
6	7,400,000	12,200,000	1,000,000	20,600,000
6	7,200,000	12,000,000	1,600,000	20,800,000
6	8,400,000	11,000,000	800,000	20,200,000
6	5,000,000	9,200,000	1,000,000	15,200,000
6	5,000,000	8,600,000	800,000	14,400,000
6	4,600,000	8,600,000	1,000,000	14,200,000
6	4,800,000	7,800,000	800,000	13,400,000
6	8,800,000	17,800,000	1,600,000	28,200,000
6	11,200,000	18,400,000	1,600,000	31,200,000
6	10,400,000	16,200,000	1,200,000	27,800,000
6	8,600,000	16,800,000	1,000,000	26,400,000
6	9,800,000	14,200,000	1,400,000	25,400,000
7	7,200,000	12,600,000	800,000	20,600,000
7	7,200,000	14,200,000	800,000	22,200,000

7	7,000,000	13,600,000	1,000,000	21,600,000
7	7,200,000	23,800,000	1,200,000	32,200,000
7	6,600,000	24,500,000	800,000	31,900,000
7	6,400,000	9,200,000	800,000	16,400,000
7	6,000,000	10,600,000	800,000	17,400,000
7	6,000,000	10,200,000	1,000,000	17,200,000
7	8,400,000	11,800,000	1,200,000	21,400,000
7	6,000,000	8,400,000	1,000,000	15,400,000
7	10,000,000	16,200,000	1,600,000	27,800,000
7	8,000,000	11,600,000	800,000	20,400,000
7	5,600,000	9,800,000	800,000	16,200,000
7	4,800,000	7,400,000	800,000	13,000,000
7	3,400,000	6,800,000	800,000	11,000,000
7	7,400,000	11,000,000	1,000,000	19,400,000
7	4,200,000	8,400,000	800,000	13,400,000
7	5,000,000	8,400,000	800,000	14,200,000
7	10,400,000	14,000,000	1,400,000	25,800,000
7	7,400,000	10,800,000	800,000	19,000,000
8	6,000,000	10,200,000	1,000,000	17,200,000
8	8,000,000	12,000,000	1,000,000	21,000,000
8	5,200,000	9,000,000	1,000,000	15,200,000
8	10,800,000	14,600,000	1,600,000	27,000,000
8	6,200,000	9,800,000	800,000	16,800,000
8	9,200,000	13,000,000	1,200,000	23,400,000
8	9,600,000	15,600,000	1,000,000	26,200,000
8	15,200,000	19,000,000	1,400,000	35,600,000
8	8,400,000	13,600,000	800,000	22,800,000
8	11,400,000	16,600,000	1,200,000	29,200,000
8	5,800,000	11,400,000	1,200,000	18,400,000
8	11,000,000	16,800,000	1,000,000	28,800,000
8	7,800,000	13,400,000	1,400,000	22,600,000
8	5,400,000	11,000,000	1,000,000	17,400,000

8	7,600,000	13,200,000	1,200,000	22,000,000
8	7,400,000	10,800,000	1,000,000	19,200,000
8	14,000,000	20,200,000	1,600,000	35,800,000
8	6,800,000	9,800,000	800,000	17,400,000
8	7,400,000	11,400,000	800,000	19,600,000
8	12,000,000	17,800,000	1,200,000	31,000,000
9	6,800,000	10,400,000	800,000	18,000,000
9	5,200,000	9,600,000	1,000,000	15,800,000
9	7,400,000	11,800,000	1,000,000	20,200,000
9	9,000,000	13,200,000	1,000,000	23,200,000
9	6,600,000	11,400,000	800,000	18,800,000
9	6,800,000	12,400,000	1,000,000	20,200,000
9	7,200,000	10,200,000	1,000,000	18,400,000
9	5,600,000	9,200,000	800,000	15,600,000
9	7,000,000	10,600,000	1,000,000	18,600,000
9	4,400,000	8,600,000	1,200,000	14,200,000
9	6,600,000	9,600,000	800,000	17,000,000
9	6,200,000	10,400,000	800,000	17,400,000
9	6,600,000	10,400,000	800,000	17,800,000
9	5,800,000	9,800,000	800,000	16,400,000
9	5,600,000	8,600,000	800,000	15,000,000
9	6,600,000	12,200,000	1,200,000	20,000,000
9	9,200,000	15,600,000	1,600,000	26,400,000
9	7,400,000	12,600,000	1,000,000	21,000,000
9	7,000,000	12,400,000	1,400,000	20,800,000
9	8,400,000	14,200,000	1,400,000	24,000,000

ANEXO II

Tabla12. PORCENTAJES DE HEMOCITOS TOTALES

PHH	PHS	PG
Porcentaje Hemocitos		
Hialinos	Semigranulosos	Granulosos
25.25	60.61	14.14
41.67	51.19	7.14
32.95	61.36	5.68
31.82	56.82	11.36
32.12	56.93	10.95
25.25	60.61	14.14
41.67	51.19	7.14
32.95	61.36	5.68
31.82	56.82	11.36
32.12	56.93	10.95
31.74	55.09	13.17
31.19	60.55	8.26
32.77	57.14	10.08
36.31	52.38	11.31
34.25	56.16	9.59
39.76	50.60	9.64
38.46	52.75	8.79
34.57	56.79	8.64
31.43	61.43	7.14
38.03	54.93	7.04
30.77	58.12	11.11
23.61	65.28	11.11
32.00	61.33	6.67
38.52	51.85	9.63
37.93	56.32	5.75
38.17	51.15	10.69

37.84	55.86	6.31
38.71	54.84	6.45
38.53	55.05	6.42
35.87	54.35	9.78
34.88	56.98	8.14
33.33	59.26	7.41
34.38	54.17	11.46
34.15	57.32	8.54
37.04	54.32	8.64
38.64	53.41	7.95
38.10	54.29	7.62
39.80	54.08	6.12
41.22	54.20	4.58
40.71	52.21	7.08
38.61	56.44	4.95
31.03	60.92	8.05
38.83	53.40	7.77
39.88	53.57	6.55
37.62	57.43	4.95
37.50	55.56	6.94
40.77	53.85	5.38
41.96	53.15	4.90
40.00	54.29	5.71
41.44	53.15	5.41
33.64	60.91	5.45
32.28	62.99	4.72
25.86	68.10	6.03
36.72	57.81	5.47
29.82	64.04	6.14
40.00	52.38	7.62
39.36	55.32	5.32
40.00	54.12	5.88

40.59	55.45	3.96
39.22	54.90	5.88
38.57	57.14	4.29
38.97	54.41	6.62
39.51	56.79	3.70
42.45	51.89	5.66
39.29	52.68	8.04
37.61	55.96	6.42
36.05	58.14	5.81
39.73	56.16	4.11
36.84	57.89	5.26
36.84	55.79	7.37
37.08	57.30	5.62
38.16	56.58	5.26
35.64	56.44	7.92
34.88	59.30	5.81
36.62	56.34	7.04
33.11	62.84	4.05
31.40	62.79	5.81
36.59	58.54	4.88
29.37	65.03	5.59
35.61	59.09	5.30
35.82	56.72	7.46
40.18	54.46	5.36
36.71	58.23	5.06
37.74	54.72	7.55
34.43	57.38	8.20
40.74	51.85	7.41
37.50	58.33	4.17
36.62	57.75	5.63
37.65	55.29	7.06
40.68	52.54	6.78

35.00	58.75	6.25
35.65	59.13	5.22
36.46	58.33	5.21
39.33	56.18	4.49
37.72	57.89	4.39
36.36	58.18	5.45
38.78	56.12	5.10
32.69	61.54	5.77
37.14	57.14	5.71
40.19	56.07	3.74
31.67	61.67	6.67
37.04	57.41	5.56
38.46	56.04	5.49
35.90	58.97	5.13
39.73	56.16	4.11
36.54	57.69	5.77
43.80	52.55	3.65
37.88	56.06	6.06
35.92	59.22	4.85
34.62	57.69	7.69
41.58	54.46	3.96
32.89	60.53	6.58
34.72	59.72	5.56
32.39	60.56	7.04
35.82	58.21	5.97
31.21	63.12	5.67
35.90	58.97	5.13
37.41	58.27	4.32
32.58	63.64	3.79
38.58	55.91	5.51
34.95	61.17	3.88
32.43	63.96	3.60

32.41	62.96	4.63
22.36	73.91	3.73
20.69	76.80	2.51
39.02	56.10	4.88
34.48	60.92	4.60
34.88	59.30	5.81
39.25	55.14	5.61
38.96	54.55	6.49
35.97	58.27	5.76
39.22	56.86	3.92
34.57	60.49	4.94
36.92	56.92	6.15
30.91	61.82	7.27
38.14	56.70	5.15
31.34	62.69	5.97
35.21	59.15	5.63
40.31	54.26	5.43
38.95	56.84	4.21
34.88	59.30	5.81
38.10	57.14	4.76
34.21	59.21	6.58
40.00	54.07	5.93
36.90	58.33	4.76
39.32	55.56	5.13
36.64	59.54	3.82
42.70	53.37	3.93
36.84	59.65	3.51
39.04	56.85	4.11
31.52	61.96	6.52
38.19	58.33	3.47
34.51	59.29	6.19
31.03	63.22	5.75

34.55	60.00	5.45
38.54	56.25	5.21
39.11	56.42	4.47
39.08	56.32	4.60
37.76	58.16	4.08
38.71	57.42	3.87
37.78	57.78	4.44
32.91	60.76	6.33
36.63	58.42	4.95
38.79	56.90	4.31
35.11	60.64	4.26
33.66	61.39	4.95
39.13	55.43	5.43
35.90	58.97	5.13
37.63	56.99	5.38
30.99	60.56	8.45
38.82	56.47	4.71
35.63	59.77	4.60
37.08	58.43	4.49
35.37	59.76	4.88
37.33	57.33	5.33
33.00	61.00	6.00
34.85	59.09	6.06
35.24	60.00	4.76
33.65	59.62	6.73
35.00	59.17	5.83

ANEXO III

Tabla 13. PROTEINAS PLASMÁTICAS

T	PM
Tratamientos	Proteína Plasmática (ug/ul ⁻¹)
1	64.04
1	95.46
1	64.63
1	98.8
1	99.39
1	92.25
2	92.25
2	107.13
2	98.14
2	105.23
2	111.18
2	89.93
3	105.46
3	71.36
3	97.13
3	87.96
3	101.54
3	90.29
4	89.75
4	103.92
4	72.79
4	108.68
4	77.01
4	79.75
5	86.54
5	113.68
5	82.25

5	113.8
5	98.2
5	76.54
6	101.06
6	84.21
6	78.68
6	97.61
6	101.18
6	129.39
7	76.71
7	116.89
7	82.79
7	64.57
7	96.36
7	100.94
8	125.94
8	126.3
8	104.27
8	114.39
8	105.64
8	111.18
9	107.25
9	86.65
9	80.7
9	125.23
9	84.04
9	117.43

ANEXO IV

Tabla 14. ANIÓN SUPERÓXIDO

	A	B	C
Tratamiento	O ₂ Ac. Ba.	O ₂ Ac. St.	O ₂ Tasa
1	44	48	1.09
1	45	47	1.04
1	48	45	0.94
1	76	115	1.51
1	52	52	1
1	50	45	0.9
2	50	47	0.93
2	48	44	0.91
2	44	43	0.98
2	44	44	1.01
2	43	45	1.05
2	47	45	0.95
3	41	46	1.11
3	42	44	1.04
3	47	42	0.89
3	42	45	1.09
3	41	44	1.09
3	41	45	1.11
4	45	45	1
4	47	44	0.93
4	42	44	1.07
4	44	44	1
4	44	44	1
4	44	45	1.02
5	41	41	1.01
5	44	43	0.98
5	38	43	1.11

5	42	47	1.14
5	42	70	1.65
5	44	55	1.26
6	44	42	0.95
6	42	45	1.07
6	40	43	1.08
6	42	45	1.07
6	44	41	0.94
6	42	48	1.14
7	41	48	1.16
7	41	43	1.05
7	46	46	0.99
7	43	51	1.19
7	45	45	1
7	46	47	1.02
8	43	47	1.07
8	44	48	1.08
8	46	43	0.95
8	45	44	0.98
8	39	40	1.03
8	42	44	1.04
9	42	44	1.04
9	41	43	1.06
9	40	46	1.15
9	45	49	1.08
9	49	50	1.02
9	46	50	1.08

ANEXO V

Tabla 15. FENOLOXIDASA

	SLA	CLA
	Fenoloxidasa	
Tratamiento	Sin La	Con La
1	38	40
1	43	46
1	44	49
2	54	58
2	39	40
2	48	54
3	45	47
3	51	52
3	44	51
4	51	58
4	74	79
4	62	62
5	55	57
5	45	46
5	43	46
6	68	73
6	40	41
6	57	61
7	64	65
7	40	41
7	43	48
8	44	46
8	54	60
8	61	65
9	65	64
9	101	106
9	99	109

ANEXO VI

Tabla 16. MINERALES

T- Rep.	Minerales (mg/Kg)			
	Zn	Cu	Mn	Se
1	0.35	1.11	1.06	0.02
1	0.44	1.45	0.99	0.01
1	1.27	1.36	0.91	0.02
1	0.29	0.82	0.9	0.02
2	1.66	1.73	0.62	0.02
2	1.51	1.9	1.04	0.02
2	0.18	1.21	1	0.03
2	0.87	1.72	0.62	0.03
3	0.78	1.23	0.28	0.03
3	1.31	1.17	1.03	0.03
3	2.31	1.14	0.63	0.04
3	0.78	0.86	0.55	0.03
4	0.69	1.47	0.81	0.01
4	1.19	1.35	0.85	0.03
4	0.38	1.31	0.46	0.03
4	0.58	0.75	1.11	0.02
5	2.24	1.64	0.84	0.03
5	2.86	5.1	0.66	0.03
5	2.73	1.32	0.71	0.02
5	2.3	1.9	0.57	0.02
6	2.46	1.16	0.6	0.02
6	0.79	1.62	1.07	0.02
6	0.59	1.82	0.94	0.02
6	0.61	0.93	0.78	0.02
7	2.67	2.94	1.05	0.02
7	0.44	0.95	1	0.01
7	0.76	4.51	0.91	0.02
7	0.64	0.95	0.61	0.02
8	0.5	2.38	0.59	0.01

8	0.23	2.22	0.56	0.02
8	0.42	4.11	0.56	0.01
8	0.83	1.78	0.6	0.02
9	0.21	0.67	0.5	0.02
9	0.26	1.08	0.61	0.02
9	0.62	1.24	0.69	0.02
9	0.64	0.7	0.47	0.03

ANEXO VII



FOTO 4. SIEMBRA DE LAS LARVAS PL 12



FOTO 5. PESCA DE LOS CAMARONES



FOTO 6. ACLIMATACIÓN DE LOS CAMARONES



FOTO 7. SEP DEL BIOENSAYO



FOTO 8. SELECCIONAR CAMARONES DE 1g



FOTO 9. ELABORACIÓN DE LAS DIETAS



FOTO 10. RECAMBIO Y AREACIÓN DEL AGUA

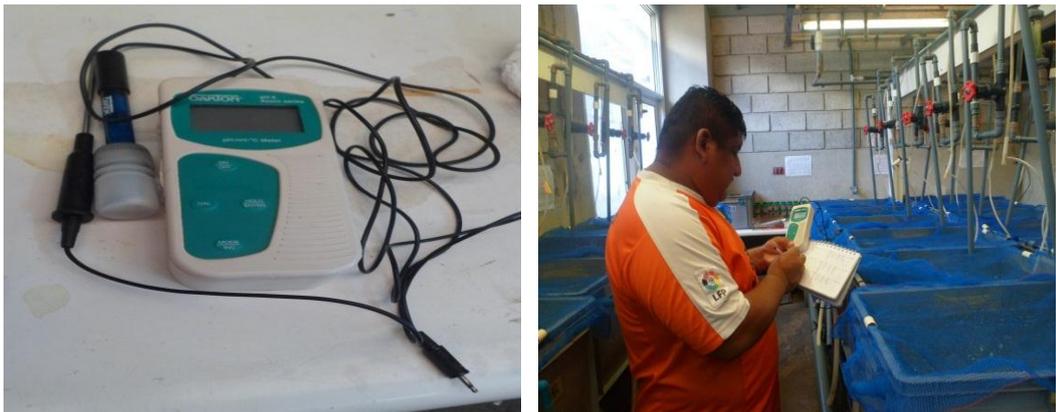


FOTO 11. PARÁMETRO FÍSICO PH



FOTO 12. PARÁMETRO FÍSICO TEMPERATURA



FOTO 13. ALIMENTACIÓN



FOTO 14. SIFONEAR EL SOBRANTE DEL ALIMENTO



FOTO 15. EXTRACCIÓN DE LA HEMOLINFA



FOTO 16. ANIÓN SUPERÓXIDO NBT



FOTO 17. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA



FOTO 18. PROTEINAS PLASMÁTICAS